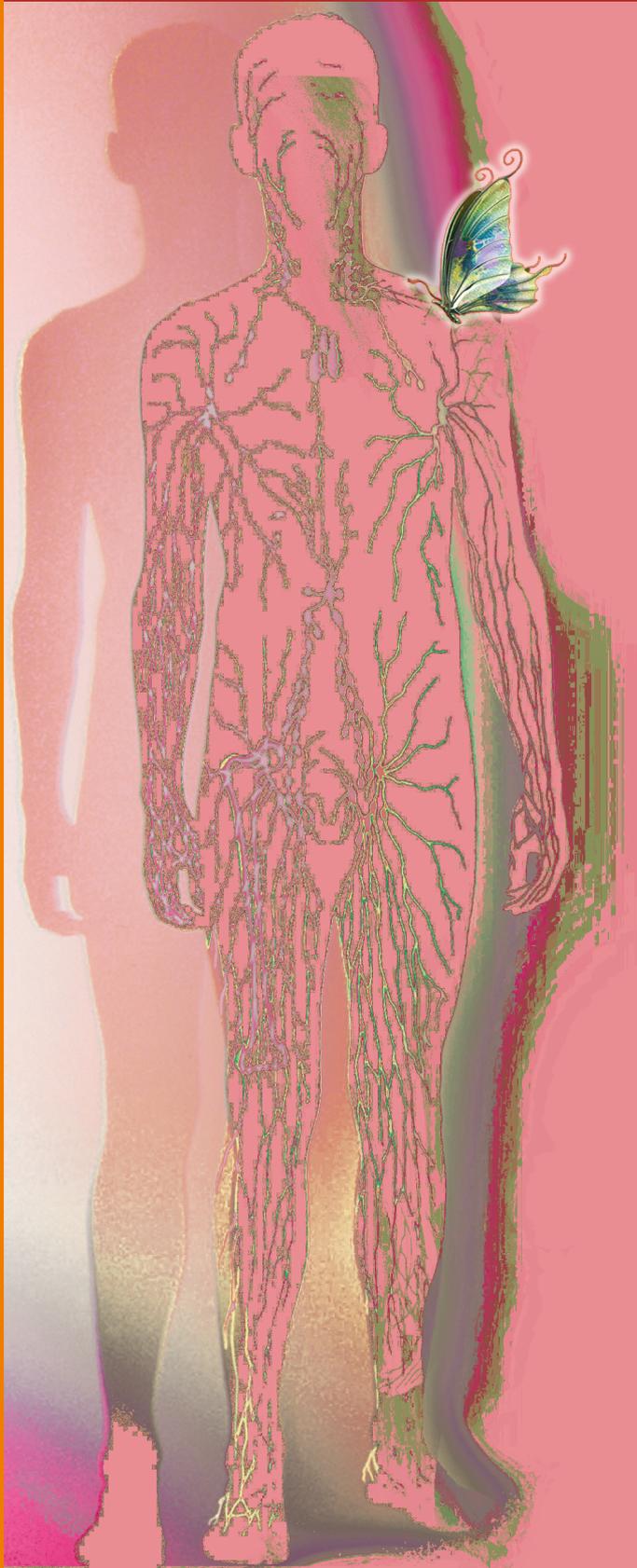


ISSN 2587-7836 (print)
ISSN 2686-8830 (online)

ФАРМАКО КИНЕТИКА и ДИНАМИКА



№ 3.2021



20

Лет работы

230+

Исследований

220+

Публикаций

38

Партнёров

Комплексная оценка для включения в ограничительные перечни



Оценка эффективности и безопасности

- систематический обзор и метаанализ
- сетевой метаанализ



Фармакоэкономический анализ

- анализ "затраты-эффективность"
- анализ "затраты-полезность"
- анализ "минимизации затрат"
- анализ влияния на бюджет



Разработка моделей в MS Excel

- модель "дерево решений"
- модель Маркова
- гибридная модель
- калькулятор



Подготовка досье на включение в

- перечень ЖНВЛП
- перечень ВЗН
- минимальный ассортимент

Также Центр занимается:

- оценкой технологий здравоохранения
- фармакоэпидемиологическими исследованиями
- изучением качества жизни, связанного со здоровьем
- неинтервенционными исследованиями

По вопросам сотрудничества обращаться к:



Белоусов Дмитрий Юрьевич
Генеральный директор
+ 7 (926) 568-17-35
clinvest@mail.ru



Чеберда Алексей Евгеньевич
Исполнительный директор
+ 7 (963) 999-77-69
aecherberda@healthconomics.ru



Афанасьева Елена Владимировна
Финансовый директор
+ 7 (916) 986-04-65
eva88@list.ru



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

Кольванов 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

Сычѳв 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 15.12.2021 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

Оформить подписку можно через «Агентство «Книга-Сервис» или каталог «Пресса России» — подписной индекс E45072

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 Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.izdat-Okii

Центр Фармакоэкономических Исследований

Market Access Solutions

Издательство ОКИ

ОБЗОРЫ

Перспективы применения препаратов адамантанового ряда для лечения цереброваскулярных и сердечно-сосудистых заболеваний

Абаимов Д. А., Шабалина А. А. 3

Организация фармакокинетических исследований

Мирошниченко И. И., Кравцова О. Ю. 12

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Влияние фенибута и атомоксетина на биосинтез и метаболизм дофамина и серотонина в мозге мышей C57BL/6

Сухорукова Н. А., Кудрин В. С., Наркевич В. Б., Ковалѳв Г. И. 20

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Гендерные различия в формировании эпилептической системы у самцов и у самок крыс в зависимости от стадий эстрального цикла на модели очаговой кобальтовой эпилепсии

Воронина Т. А., Литвинова С. А., Филатова Ю. Б. 26

Динамика кардиоэлектрического поля крыс при хроническом воздействии доксорубицина в период деполяризации предсердий

Смирнова С. Л., Суслонова О. В., Роцевская И. М. 31

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Популяционный фармакокинетический анализ в программе Lixoft Monolix

Платова А. И. 36



Издательство
ОКИ

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

Kolyvanov 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

Starodubtcev 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-ok.ru

Zhuk Elena

Design and layout

e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 15.12.2021 r. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com

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

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

FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»

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

You can subscribe via the «Agency «Book-Service» or the catalog

«Press of Russia» — **Index E45072**

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 PI No. 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-Ok.ru

Center of Pharmacoeconomics Research

Market Access Solutions

Publisher OKI

REVIEWS

Perspective for the use of adamantane-type drugs for the treatment of cerebrovascular and cardiovascular diseases
Abaimov DA, Shabalina AA 3

Organizing of pharmacokinetic investigations
Miroshnichenko II, Kravtsova OYu 12

MODE OF ACTION

Effect of phenibut and atomoxetine on the biosynthesis and metabolism of dopamine and serotonin in the brain of C57BL / 6 MICE
Sukhorukova NA, Kudrin VS, Narkevich VB, Kovalev GI..... 20

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Gender differences in the formation of the epileptic system in male and female rats depending on the stage of the estrous cycle on the model of focal cobalt epilepsy
Voronina TA, Litvinova SA, Filatova YuB 26

Dynamics of the cardioelectric field of rats under chronic exposure to doxorubicin during atrial depolarization
Smirnova SL, Suslonova OV, Roshchevskaya IM 31

POPULATION PHARMACOKINETICS

Population pharmacokinetics analysis in Lixoft Monolix software
Platova AI 36

Перспективы применения препаратов адамантанового ряда для лечения цереброваскулярных и сердечно-сосудистых заболеваний

Абаимов Д. А., Шабалина А. А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научный центр неврологии", Москва, Россия

Аннотация. Препараты адамантанового ряда широко применяются в фармакологии в качестве антимикробных, противоопухолевых, иммуносупрессивных, гормональных, гипогликемических, анальгетических, противовоспалительных и нейротропных средств. В представленном обзоре суммируется информация о доклинических и клинических исследованиях, связанных с применением адамантанов для лечения различных сосудистых патологий. Оцениваются перспективы применения мемантина, амантадина, вилдаглиптина и ряда инновационных препаратов для профилактики и лечения церебро- и кардиоваскулярных заболеваний.

Ключевые слова: адамантан; амантадин; мемантин; вилдаглиптин; 5-гидроксиадамantan-2-он; инсульт; ишемия; цереброваскулярные заболевания

Для цитирования:

Абаимов Д. А., Шабалина А. А. Перспективы применения препаратов адамантанового ряда для лечения цереброваскулярных и сердечно-сосудистых заболеваний. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(3):3–11. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-3-11>

Поступила: 26 ноября 2021 г. **Принята:** 02 декабря 2021 г. **Опубликована:** 15 декабря 2021 г.

Perspective for the use of adamantane-type drugs for the treatment of cerebrovascular and cardiovascular diseases

Abaimov DA, Shabalina AA

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Abstract. Adamantane-type drugs are widely used in pharmacology as antimicrobial, antitumor, immunosuppressive, hormonal, hypoglycemic, analgesic, anti-inflammatory and neurotropic drugs. The review summarizes information on preclinical and clinical studies related to the treatment of various vascular pathologies. Assess the prospects for using memantine, amantadine, a number of innovative drugs for the prevention and treatment of stroke and cardiovascular diseases.

Keywords: adamantane; amantadine; memantine; vildagliptin; 5-hydroxyadamantan-2-one; stroke; ischemia; cerebrovascular disease

For citations:

Abaimov DA, Shabalina AA. Perspective for the use of adamantane-type drugs for the treatment of cerebrovascular and cardiovascular diseases. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(3):3–11. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-3-11>

Received: July 18, 2021. **Accepted:** December 02, 2021. **Published:** December 15, 2021

Введение / Introduction

Адамантан — химическое соединение, название которого происходит от греческого «adamantinos» («относящийся к алмазу или стали»), представляет собой трициклический мостиковый углеводород с формулой $C_{10}H_{16}$, имеющий химический каркас с уникальной симметричной жёсткой структурой, которая содержит три циклогексана, соединённых друг с другом в конформации стула, аналогично структуре алмазной решётки. Данная структура имеет высокую жёсткость, которая в тоже время практически свободна от напряжений [1, 2]. Это бесцветное кристаллическое химическое соединение с камфороподобным запахом. Структура адамантана с его тетраэдрической и объёмной геометрией молекулы, обуславливает наличие у него ряда нехарактерных физико-химических свойств, таких как хорошая термическая и окислительная стабильность, чрезвычайная липофильность и низкая энергия [3, 4], что находит отражение в его высокой структурной стабильности. Адамантан был впервые выделен из нефти в Чехословакии в 1933 году [5], но прошло несколько десятилетий, прежде чем его важность была полностью понята. В 1957 году

von R Schleyer P и соавт. [6] опубликовали простую схему синтеза адамантана (трицикло [3,3,1,1] декан), посредством индуцированной кислотой Льюиса перегруппировки предшественника $C_{10}H_{16}$ тетрагидродипентациена. Открытие адамантана и изучение его свойств послужило импульсом к развитию одной из областей современной органической химии — химии органических полиэдров. Впоследствии, 7 лет спустя, в 1964 г. Davies W и соавт. [7] выявили значительную противовирусную активность амантадина (1-аминоадаманта), амантадина, замещённого аминогруппой в узловом положении. Затем было синтезировано значительное число производных адамантана, которые были испытаны на их биологическую активность, что привело к открытию нескольких лекарств, которые в настоящее время используются в клинической практике. Среди них есть противовирусные, противодиабетические, противомикробные, противовоспалительные и действующие на ЦНС соединения. Считается, что особенности биологического действия производных адамантана во многом связаны с наличием объёмного и высоколипофильного каркасного ядра. Липофильность (гидрофобность) адамантанового ядра определяет возможности не-

посредственного взаимодействия молекул его замещённых производных с биологическими мембранами, содержащими липидный бислой, а также с гидрофобными фрагментами белков, в том числе, входящими в структуру рецепторных образований. Высокая липофильность и объёмная структура адамантановго радикала при его введении в молекулы различных биологически активных соединений в значительной мере модифицирует их фармакологическое действие. Таким образом, была модифицирована структура ряда антимикробных, противоопухолевых, иммуносупрессивных, гормональных, гипогликемических, анальгетических, противовоспалительных и нейротропных средств [8]. Адамантильная группа присутствует в семи соединениях в текущем клиническом применении (амантадин, мемантин, римантадин, тромантадин, адапален, вилдаглиптин, саксаглиптин) и во многих других соединениях, которые разрабатываются в качестве потенциальных терапевтических средств. Обширность и большая вариативность фармакологических свойств данной группы соединений даёт основания предположить, что среди производных адамантана могут быть обнаружены соединения с эффектами в отношении кардио- и цереброваскулярных расстройств.

Мемантин / Memantine

Одним из первых препаратов, протестированных на фармакологическую активность в отношении инсульта, ожидаемо стал наиболее широко известный нейротропный препарат мемантин (рис. 1).

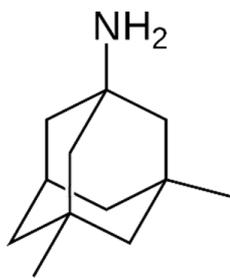


Рис. 1. Структурная формула мемантина
Fig. 1. Structural formula of memantine

Ещё в 1999 году исследователями *Stieg и соавт.* был изучен фармакологический эффект мемантина и показано его нейропротекторное действие на биологической модели тромботического инсульта у новорождённых крыс. Кроме того, была обнаружена значимая корреляция между размером инфаркта, определённым по магнитно-резонансной томографии (МРТ) и результатами гистопатологического анализа у тех же животных. Обнаружено, что однократная доишемическая доза мемантина (20 мг/кг), вводимая

за 15 мин до индукции инсульта, уменьшает размер очага инфаркта на 36,3 % по сравнению с контрольными животными, получавшими физиологический раствор ($p < 0,0001$).

К настоящему времени в отношении мемантина собран довольно большой массив данных доклинических исследований как *in vitro*, так и *in vivo*, на различных экспериментальных моделях ишемии и инсульта, где данный препарат показал целый ряд фармакологических эффектов, проявляющихся в компенсации различных патологических процессов. Так, проведённые исследования на модели острой церебральной ишемии у крыс продемонстрировали, что лечение мемантином устраняет гипоксическое повреждение нервных клеток, уменьшает размер очага инфаркта и выраженность неврологического дефицита, а также предотвращает нарушения памяти [9–11]. В исследовании *Dogan A и соавт.* [12], лечение мемантином уменьшало степень выраженности отёка головного мозга и объём инфаркта при транзиторной ишемической атаке на фоне спонтанной гипертонической болезни крыс. *Montagne A и соавт.* [13] показали, что мемантин смягчает отрицательные эффекты тканевого активатора плазминогена при тромболизисе, прежде всего такие, как NMDA-опосредованная нейротоксичность и геморрагическая трансформация, а кроме того увеличивает терапевтическое окно для проведения тромболизиса. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе фармакологических эффектов мемантина, которые могут защитить нервные клетки от ишемии, остаются не вполне изученными [14, 15]. Часть этих механизмов может быть объяснена на основании данных, полученных в исследовании *Cho G-S и соавт.* [16] на оригинальной модели эксайтотоксичности, индуцированной введением в мозолистое тело нейротоксина — смеси липополисахаридов из мембран грамотрицательных бактерий. Обнаружено, что микроинъекция липополисахаридов в *corpus callosum* за 1 день до ишемического инсульта, вызванного временной окклюзией средней мозговой артерии, усиливает интранейрональное повышение уровня ионов кальция Ca^{2+} в мозге крыс. Также обнаружено, что внутрибрюшинное введение мемантина достоверно снижало липополисахарид-индуцированный подъём уровня кальция и уменьшало ишемическое повреждение ткани. В ряде доклинических исследований мемантин уменьшал воспаление, интенсивность апоптоза, объём области гематомы и улучшал функциональное восстановление в нетравматической модели ишемии, снижал выраженность неврологических нарушений и эмоционального стресса у животных, предотвращал гибель животных в посттравматической модели ишемии, вызывал гипотермию, а также уменьшал церебральное ишемическое повреждение, индуцированное липополисахаридами, посредством снижения притока кальция внутрь клеток и увеличения тканевой концентрации различных факто-

ров роста, прежде всего нейротрофического фактора мозга (BDNF). Также продемонстрирован эффект мемантина по предотвращению митохондриальных нарушений и уменьшению связанных с этим энергопотерь [16–19]. Профилактическое применение мемантина в большинстве исследований приводило к уменьшению объёма инфаркта мозга. *el Nasr MS и соавт.* [20] показали, что введение мемантина профилактически в ранний постишемический период в дозе 10 мг/кг значительно уменьшает интенсивность повреждения нейронов в гиппокампе крыс. Кроме того, *Block F и Schwarz M* [21] показали, что введение мемантина в дозе 20 мг/кг за 20 мин до ишемии уменьшает повреждение нейрональных клеток в полосатом теле и области CA1 гиппокампа и уменьшает дефицит пространственного обучения, измеряемый с помощью плавательного лабиринта Морриса. В то же время мемантин в дозе 10 мг/кг не влиял на морфологические изменения и функциональные результаты, что свидетельствует в пользу дозозависимого характера его фармакологических эффектов. В другом исследовании *Culmsee и соавт.* (2004) сообщали, что мемантин сам по себе эффективно уменьшал размер инфаркта при введении за 30 минут до и сразу после начала ишемического инсульта. Однако применение комбинации мемантина и кленбутерола — известного агониста бета2-адренорецептора — более эффективно расширяла терапевтическое окно и уменьшала степень повреждения мозга, обеспечивая синергетическую нейропротекцию. *Babu CS и Ramanathan M* [22] исследовали нейропротекторное влияние инъекции мемантина (20 мг/кг) на нейрохимические, поведенческие и неврологические показатели во время различных фаз ишемии. Они продемонстрировали, что предварительная обработка мемантином снижает тканевые уровни глутамата и глутаминсинтазы во всех областях головного мозга, значительно уменьшает повреждение нервных клеток, улучшает исследовательское поведение и способствует восстановлению неврологического дефицита по сравнению с контрольной группой. Мемантин также снижал уровень лактата в плазме при использовании в пре- и пост-ишемической фазе. Профилактическое (доишемическое) использование мемантина также увеличивало активность Na/K-АТФазы в ишемизированных тканях головного мозга и уровень восстановленного глутатиона, который, как известно, играет важную роль в качестве антиоксиданта в защите от активных форм кислорода (АФК), окислительного стресса и апоптоза в ишемизированном гиппокампе, стриатуме и коре головного мозга. Было также обнаружено, что введение мемантина (20 мг/кг) за полчаса до ишемии уменьшало объём инфаркта мозга и впоследствии улучшало неврологический исход через 24 часа. Мемантин значительно уменьшал апоптоз корковых нейрональных клеток, вызванный кислородно-глюкозной депривацией и увеличивал жизнеспособность указанных клеток.

Кроме того, мемантин усиливал экспрессию белка постсинаптической плотности-95 (PSD-95), которая сильно снижается в течение первых часов после первичного инсульта; причём в предыдущих исследованиях было показано, что именно деградация белка PSD-95 способствовала чрезмерной активации рецепторов NMDA, что приводило к снижению когнитивных функций [23, 24].

Оригинальные данные были получены в исследовании *Gu SX и соавт.* [25] на модели ишемического инсульта у трансгенных мышей, дефицитарных по гену цистатионин-бета-синтазы (CBS), что выражалось в гипергомоцистеинемии различной степени выраженности. Было показано, что введение мемантина защищало от церебрального инфаркта и разрушения гематоэнцефалического барьера, причём этот эффект обнаруживался только у мышей с умеренным избытком гомоцистеина (Cbs +/-), но в то же время введение мемантина не оказывало значимого эффекта у мышей с сильной гипергомоцистеинемией (Cbs -/-), что может быть связано с изменениями в уровне экспрессии субъединиц N-метил-D-аспаратного рецептора в группе Cbs -/-. Мыши Cbs -/-, но не Cbs +/-, демонстрировали повышенную экспрессию субъединицы NR2B, которая, как известно, относительно нечувствительна к гомоцистеину. Это позволяет предположить, что именно антагонизм в отношении N-метил-D-аспаратного рецептора может стать основой для стратегии предотвращения реперфузионного повреждения после острого ишемического инсульта у пациентов с умеренной гипергомоцистеинемией. *Chen B и соавт.* [14] было показано, что мемантин уменьшает секрецию матриксной металлопептидазы 9 (MMP-9) и таким образом помогает защитить целостность гематоэнцефалического барьера, препятствуя деградации коллагена IV. Мемантин также может прерывать нейровоспалительный цикл, уменьшая количество гиперактивированной микроглии и астроцитов и уменьшая экспрессию матриксной металлопептидазы после ишемии. Влияние мемантина на уровень матриксных металлопептидаз было частично подтверждено и в исследовании *Liu C и соавт.* [9]. Авторы показали, что после ишемии-реперфузии мемантин снижает экспрессию и активность матриксной металлопротеиназы MMP-2, но не оказывает действия на активность MMP-9. Кроме того, важным результатом указанной работы стало обнаружение у этого препарата способности предотвращать индуцированную экспрессию фактора некроза опухоли- α (TNF- α) и интерлейкина-1 β как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Принципиально важным результатом, полученным этой группой учёных, стало обнаружение у мемантина способности значительно снижать проницаемость эндотелиального монослоя после ишемии-реперфузии за счёт увеличения экспрессии белка плотных контактов окклюдина и белка адгезивного соединения VE-кадгерина. Было также показано, что

профилактическое введение мемантина увеличивает региональный мозговой кровоток, уменьшает концентрацию метаболитов гидроксильных радикалов и выраженность окислительного стресса [26]. *Trotman M и соавт.* [27] показали дозозависимые эффекты мемантина при лечении ишемического инсульта. Они обнаружили, что профилактическое введение низких доз мемантина (0,2 мг/кг в день *in vivo* и 0,5 моль/л *in vitro*) уменьшает объём инфаркта головного мозга на 50 %, способствует поведенческой сохранности и уменьшает гибель клеток, вызванную кислородно-глюкозной депривацией. Неожиданным оказалось то, что при введении мемантина в более высоких дозах (20 мг/кг в день *in vivo* и 300 моль/л *in vitro*) препарат, напротив, увеличивает объём зоны ишемического повреждения и увеличивает индуцированную гибель клеток, вызванную кислородно-глюкозной депривацией. Эти данные подтверждают результаты предыдущих исследований, которые указывают на токсические эффекты высоких доз мемантина, особенно при профилактическом и раннем применении [28]. Этот неблагоприятный эффект может быть связан с различными взаимодействиями мемантина с рецепторами, отличными от NMDA (такими как различные рецепторы серотонина и никотиновые рецепторы ацетилхолина) или с чрезмерно быстрым введением лекарственного средства [29]. *Aluclu MU и соавт.* [30] показали, что введение 30 мг/кг мемантина сразу через 2 ч после начала церебральной ишемии улучшает неврологические исходы и уменьшает размер инфаркта через 1 неделю после реперфузии. В исследовании, в котором оценивалось влияние мемантина на клинические исходы множественных инфарктов при моделировании эмболического инсульта на кроликах, *Lapchak PA* [29] обнаружил, что медленная внутривенная инфузия мемантина (25 мг/кг) в течение 60 минут улучшает поведенческие результаты при введении через 60 мин после эмболизации сгустка. Более низкие дозы мемантина (1 и 10 мг/кг) не влияли на поведенческий дефицит. Кроме того, обнаружено, что болюсная инъекция высокой дозы мемантина (25 мг/кг) была смертельной. *Liu C и соавт.* [9] изучали нейропротекторные эффекты мемантина, топирамата и их комбинации при гипоксически-ишемической травме головного мозга. Они продемонстрировали, что инъекция мемантина (20 мг/кг) сразу после гипоксии головного мозга значительно снижает макро- и микроскопические повреждения в тканях головного мозга, а комбинация мемантина с топираматом демонстрирует ещё более выраженные протекторные антиишемические эффекты.

Они также показали, что мемантин сводит к минимуму количество апоптотических клеток в области CA1 гиппокампа и субкортикального белого вещества по сравнению с группой контроля. В исследовании *Gamdzyk M и соавт.* [31] было показано, что инъекция мемантина (20 мг/кг) после гипоксемической травмы

головного мозга с последующими многократными инъекциями в течение следующих 2 дней приводила к уменьшению площади инфаркта, снижению интенсивности апоптоза и уменьшению уровня активных форм кислорода. Таким образом, раннее введение мемантина приводит к заметно более выраженной нейропротекции. Недавнее исследование *Chen B и соавт.* [14], который оценил молекулярные механизмы мемантина в лечении ишемии, сообщил, что мемантин, введённый сразу после ишемии (20 мг/кг) защищает нейроны гиппокампа от гибели, вызванной уменьшением концентрации АТФ, снижает интенсивность апоптоза клеток в области ишемической полутени, уменьшает объём инфаркта мозга, и улучшает неврологические исходы через 24 ч после ишемического инсульта. В этом же исследовании были показаны биохимические механизмы реализации протекторного эффекта мемантина. Авторы показали, что мемантин подавляет избыточную экспрессию кальпаина 1 и 2, следовательно, снижает активный уровень каспазы-3, ингибирует расщепление MAP-2 и PSD-95 в области ишемической полутени, подавляя тем самым гибель нейрональных клеток. Мемантин также может способствовать восстановлению путём ингибирования сверхактивированных экстрасинаптических глутаматных рецепторов после инсульта, а также через повышение уровня BDNF и других нейротрофинов [32–34]. Профилактическое (доишемическое) использование мемантина предотвращало гибель клеток в полутени, а его постишемическое использование в основном было связано с улучшенным долгосрочным восстановлением [35]. В исследовании *Wang Fu и соавт.* [36] на модели ишемического инсульта у крыс линии Sprague-Dawley, вызванным путём окклюзии средней мозговой артерии была показана высокая эффективность комбинации малой дозы мемантина (5 мг/кг) и гипербарической кислородотерапии. Применение указанной комбинации значительно восстанавливало неврологические показатели и уровни интерлейкина IL-10, а также значительно уменьшало объём инфаркта и увеличивало антиоксидантную активность. Эти результаты подразумевают, что комбинация терапии мемантином и гипербарической оксигенацией не только продлевает терапевтическое окно лечения гипербарической оксигенацией, но также позволяет снизить дозировку мемантина. Механизм, лежащий в основе нейропротекторных эффектов комбинированного лечения, может заключаться в снижении проницаемости гематоэнцефалического барьера, ингибировании воспалительного ответа и повышении антиоксидантной ферментативной активности. Уменьшая объём инфаркта в полутени за счёт её нейропротекторных эффектов в острой фазе, длительное и продолжительное введение мемантина во время постострой фазы инсульта может увеличить пластичность коры и долгосрочное восстановление, продолжая оказывать поддержку нейронам и тем са-

мым увеличивая рост и прорастание нервных клеток в восстанавливающейся ткани мозга. В немногих исследованиях оценивалась эффективность мемантина для лечения ишемического инсульта и сосудистой ишемии в клинических условиях.

Несмотря на такой большой массив доклинических исследований, клинических испытаний мемантина у пациентов с ишемией и инсультом до настоящего времени было проведено сравнительно немного. В исследовании *Berthier ML и соавт.* от 2009 года [37] были исследованы эффекты применения мемантина (20 мг/день) на реабилитацию постинсультных пациентов, страдающих афазиями. Авторами было проведено рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование в параллельных группах пациентов, из которых первая группа получала мемантин, вторая группа получала так называемую «терапию, ограничивающую использование невербальных средств коммуникации» (СИАТ), третья группа получала терапию СИАТ в комбинации с фармакотерапией мемантином. Все эти группы исследовались в сравнении с группой, получавшей плацебо. Было показано, что как мемантин, так и терапия СИАТ уменьшали тяжесть афазии, но наилучшие результаты были достигнуты при сочетании мемантина с СИАТ. Благоприятные эффекты мемантина и СИАТ сохранялись в течение длительного периода наблюдения (48 недель). В другом исследовании *Bakhshayesh-Eghbali B и соавт.* [38] исследовали эффективность введения мемантина (в дозе 10 мг/кг в первый месяц и в дозе 20 мг/кг во второй и третий месяцы) пациентам с церебральной ишемией. Авторы продемонстрировали, что введение мемантина в первые 24 часа после ишемии приводит к значительному улучшению моторной функции и функциональной независимости через 3 месяца по сравнению с плацебо. Однако ни мемантин, ни плацебо не смогли улучшить результаты пациентов с ишемией к 7-му дню или выписке. В другом небольшом исследовании, в котором оценивались краткосрочные результаты наблюдения, *Kafi H и соавт.* [39] сообщили, что введение высоких доз мемантина (три раза в день по 20 мг/кг) в первые 24 часа после начала ишемического инсульта от лёгкой до умеренной степени и в течение первых 5 дней значительно улучшало неврологический исход. В настоящее время идёт два продолжающихся клинических испытания, в которых оценивают эффективность мемантина на исходы у пациентов с ишемическим инсультом (Clinical Trials. Gov идентификаторы: NCT02535611 и NCT02144584). В двойном рандомизированном открытом исследовании, в котором участвовали пациенты с церебральными тромбоэмболическими нарушениями, варьирующими от лёгкой до умеренной степени тяжести, поступившие в больницу имама Хоссейна (г. Тегеран, Иран) в течение предшествующих 24 часов больные были разделены на две группы: группу, получавшую мемантин (в качестве дополнительной терапии) и группу контроля.

Все пациенты проходили лечение в соответствии с рекомендациями Американской кардиологической ассоциации и Американской ассоциации инсульта (AHA/ASA). Пациенты в группе мемантина получали традиционное лечение с параллельным введением мемантина в дозе 20 мг/сут. Тестирование пациентов, согласно шкале инсульта Национального института здоровья (NIHSS), проводилось и регистрировалось ежедневно. Основной целью было сравнение изменений параметров NIHSS в исследуемых группах на 1-й и 5-й день вмешательства. Пациенты были рандомизированы и разделены на контрольную группу (15 женщин и 14 мужчин, возраст $70,78 \pm 10,92$ года) и группу мемантина (16 женщин и 8 мужчин, возраст $73,33 \pm 9,35$ года). В исследовании было обнаружено, что параметры NIHSS значительно различались между контрольной группой ($1,24 \pm 0,96$) и группой, получавшей мемантин ($2,96 \pm 0,1$) ($p < 0,0001$). Таким образом, результаты, полученные в данном исследовании, показывают, что мемантин, добавленный к стандартному лечению инсульта, может привести к значительному снижению NIHSS, что подтверждает значительное улучшение основных неврологических функций у пациентов.

Амантадин / Amantadine

Влияние адамантанов на функциональные характеристики крови известны достаточно давно. Ещё в 1977 году *Colman RW и соавт.* [40] была продемонстрирована способность препаратов адамантанового ряда ингибировать агрегацию тромбоцитов. В 1981 году в исследовании *Wesemann W и соавт.* [41] было показано, что амантадин (рис. 2) и его аналоги из группы 1-аминоадамантанов способны индуцировать высвобождение адениновых нуклеотидов и серотонина из тромбоцитов, причём данные электронной микроскопии тромбоцитов, обработанных 1-аминоадамантанами, показали, что АТФ, АДФ и 5-НТ высвобождаются из органелл в результате экзоцитозоподобного процесса, а не в результате разрушения цитоплазматических мембран и органелл.

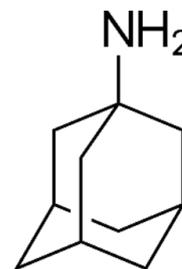


Рис. 2. Структурная формула амантадина
Fig. 2. Structural formula of amantadine

Авторы также показали, что АДФ-стимулированная агрегация тромбоцитов ингибируется преинкубацией с 1-аминоадамантами, что согласуется с данным *Colman RW и соавт.* [40]. Впоследствии вышеуказанные данные были повторно подтверждены в исследовании *Donath E и соавт.* [42], которые проверили влияние амантадина, римантадина и анионного аналога амантадина (1-адамantanкарбоновой кислоты) на осмотический гемолиз мембран эритроцитов и агрегацию тромбоцитов. Была показана способность всех трёх исследуемых препаратов к ингибированию агрегации тромбоцитов и к подавлению осмотического гемолиза, причём при низких концентрациях противовирусных препаратов способность препаратов вызывать изменение формы эритроцитов и подавлять осмотический гемолиз была количественно пропорциональна их клинической активности (ремантадин более эффективен, чем амантадин в той же концентрации). В отношении ингибирования агрегации тромбоцитов наибольшую эффективность продемонстрировала 1-адамantanкарбоновая кислота. Возможным механизмом, лежащим в основе способности препаратов адамантанового ряда подавлять агрегацию тромбоцитов, является их антагонизм с NMDA-рецепторами. В исследовании *Kalev-Zylinska ML и соавт.* от 2014 года [43] было показано, что агонисты NMDA-рецепторов усиливают, а антагонисты NMDA-рецепторов, напротив, ингибируют активацию тромбоцитов. Так, низкие концентрации (100 мкМ) МК-801 и мемантина ингибировали индуцированную адреналином агрегацию тромбоцитов на 17 ± 6 и 25 ± 5 %, соответственно ($p < 0,05$). Агонисты NMDA-рецепторов не вызывали усиление агрегации тромбоцитов сами по себе, но усиливали агрегацию, инициированную низкими концентрациями АДФ. Интересен тот факт, что по сравнению с семью возможными субъединицами NMDA-рецепторов, которые содержатся в нейронах, тромбоциты человека содержат только четыре субъединицы — GluN1, GluN2A, GluN2D и GluN3A. Присутствие транскриптов NMDA-рецепторов в тромбоцитах подразумевает способность тромбоцитов регулировать экспрессию NMDA-рецепторов «по требованию». Проточная цитометрия и электронная микроскопия показали, что в неактивированных тромбоцитах субъединицы NMDA-рецепторов преимущественно содержались внутри тромбоцитов, но перемещались на цитоплазматическую мембрану после активации тромбоцитов.

Глиптины / Gliptins

Глиптины — новая группа пероральных гипогликемических агентов, реализующих свой эффект посредством ингибирования фермента дипептидилпептидазы 4 (ДПП-4), которые используются преимущественно в фармакотерапии сахарного диабета 2 типа. В клинической практике в настоящее время

применяется 13 препаратов из указанной группы. Два из них — вилдаглиптин (рис. 3А) и саксаглиптин (рис. 3Б) — содержат в своей структуре адамантановый фрагмент.

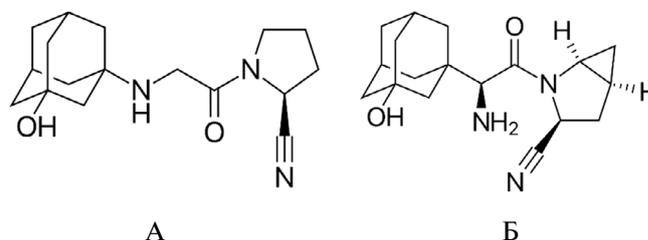


Рис. 3. Структурные формулы глиптинов:

А — Структурная формула вилдаглиптина, Б — структурная формула саксаглиптина

Fig. 3. Structural formulas of gliptins:

А — structural formula of vildagliptin, Б — structural formula of saxagliptin

Примечательно, что именно вилдаглиптин обнаружил протективные свойства на модели ишемии-реперфузии, вызванной окклюзией сонной артерии на модельных животных. В исследовании *El-Marasy SA и соавт.* [44] анестезированных крыс Вистар подвергали окклюзии левой средней мозговой артерии или фиктивной операции с последующей реперфузией через 30 мин (группа контроля). Другим трём группам профилактически вводили вилдаглиптин в различных дозах (2,5; 5; 10 мг/кг р.о.) в течение трёх недель перед тем, как подвергнуть левоочаговой церебральной ишемии-реперфузии и продолжали введение препарата до конца исследования. Неврологический дефицит и двигательную активность авторы оценивали через 24 часа после реперфузии. Было показано, что профилактика вилдаглиптином улучшала выраженность неврологического дефицита, повышала двигательную активность и улучшала координацию движений. Кроме того, вилдаглиптин уменьшал содержание малонового диальдегида, увеличивал уровень восстановленного глутатиона, увеличивал активность фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), увеличивал фосфорилирование протеинкиназы В (p-AKT) и снижал экспрессию белка каспазы-3 в ткани левого полушария головного мозга крыс. Важно отметить, что вилдаглиптин обнаружил дозозависимый эффект в отношении защиты от гибели нейрональных клеток и снижения степени выраженности основных гистопатологических изменений у крыс. Примечательно, что у вилдаглиптина были обнаружены также кардиопротекторные свойства, что было показано в исследовании *Pongkan W и соавт.* [45]. В этом исследовании изучалось влияние тестостерона и вилдаглиптина на сердечную функцию, аритмогенез и размер инфаркта в сердце крыс после ишемии-реперфузии. Исследование проводилось на животных, лишённых тестостерона, с резистентностью к инсулину и с ожирением. Самцов крыс Wistar с орхиэктомией (O) или имитацией (S) разделили

на 2 группы, которые получали нормальную диету (НД) или диету с высоким содержанием жира (ВСЖ) в течение 12 недель. Крыс с орхиэктомией в каждой диете разделяли на подгруппы, одна из которых получала тестостерон (2 мг/кг), а другая вилдаглиптин (3 мг/кг) ежедневно в течение 4 недель. Группа контроля получала физиологический раствор. Затем выполняли ишемию-реперфузию путём 30-минутной перевязки левой передней нисходящей коронарной артерии с последующей 120-минутной реперфузией. Была определена функция левого желудочка, показатели аритмии, размер инфаркта и митохондриальная функция сердца. На 12-й неделе у животных с диетой ВСЖ развивается резистентность к инсулину. На 16-й неделе сердечная функция была нарушена у всех групп крыс с орхиэктомией, не получавших лечение, но у всех крыс, получавших тестостерон и вилдаглиптин, она, напротив, была в норме. Во время травмы, нанесённой ишемией-реперфузией, показатели аритмии, размера инфаркта и сердечной митохондриальной дисфункции были значительно увеличены у крыс с орхиэктомией, получавших нормальную и высокожировую диету, а также у ложноперирированных крыс на высокожировой диете, по сравнению с таковыми параметрами у ложноперирированных крыс на нормальной диете. Лечение тестостероном или вилдаглиптином также защищало от этих повреждений во время ишемии-реперфузии. Таким образом, было показано, что вилдаглиптин обладает способностью компенсировать показатели аритмии, размера инфаркта и сердечной митохондриальной дисфункции на модели ишемии-реперфузии сердца, что говорит о наличии в спектре фармакологических эффектов вилдаглиптина выраженного сосудистого компонента.

Новые препараты адамантанового ряда, обладающие цереброваскулярными и кардиоваскулярными фармакологическими свойствами / New drugs of the adamantan series with cerebrovascular and cardiovascular pharmacological properties

В настоящее время продолжают синтезировать новые производные адамантана. Некоторые из них являются потенциальными кандидатами для применения в области лечения различных сосудистых заболеваний как из группы кардиоваскулярных патологий, так и в области цереброваскулярных расстройств. Так, в исследовании *Mirzoyan RS и соавт.* от 2014 года [46] изучался инновационный препарат 5-гидроксиадамantan-2-он в сравнении с мемантином на модели локальной постоянной ишемии головного мозга, вызванной окклюзией средней мозговой артерии у крыс, с оценкой морфологического состояния ткани головного мозга. Выживаемость крыс с гипергравитационной ишемией также была целью исследования. Выявлена существенная разница между влиянием вышеуказанных веществ на кровоток в ишемизированном

мозге. Было показано, что 5-гидроксиадамantan-2-он усиливает кровоток и снижает тонус сосудов у крыс с глобальной постоянной ишемией головного мозга и не оказывает такого цереброваскулярного воздействия на мозг интактных крыс, в то время как мемантин уменьшает кровоток как в интактном, так и в ишемизированном мозге. Кроме того, авторами было показано, что 5-гидроксиадамantan-2-он способствует восстановлению компенсаторных процессов регенерации в нервных клетках, аксонах, глиальных клетках и увеличивает количество сосудов микроциркуляторного русла. Полученные результаты указывают на нейропротекторное действие соединения, которое было подтверждено результатами экспериментов с гипергравитационной ишемией на крысах, где выживаемость животных значительно повышалась на фоне введения препарата 5-гидроксиадамantan-2-он. Одним из нейропротекторных механизмов, продемонстрированных для препарата 5-гидроксиадамantan-2-он, была его способность усиливать кровообращение в ишемическом мозге, что не проявлялось на фоне действия специфического антагониста ГАМК-рецептора бикуккуллина. Это доказывает участие ГАМК-ергических механизмов в регуляции тонуса сосудов головного мозга для реализации цереброваскулярных эффектов изучаемого соединения.

Результаты, полученные в отношении препарата 5-гидроксиадамantan-2-он и мемантина, были подтверждены в работе *Танашиян М.М. и соавт.* от 2016 года [47] на модели глобальной ишемии, которую вызывали 10-минутной окклюзией обеих общих сонных артерий с одновременным снижением артериального давления до 40–50 мм рт. ст. методом кровопускания с последующей реинфузией. Кроме того, в указанной работе было изучено влияние препарата 5-гидроксиадамantan-2-он и мемантина на процесс агрегации тромбоцитов. При исследовании влияния мемантина *in vitro* на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, на группе, состоящей из 52 больных было показано, что у 39 из них агрегация тромбоцитов крови под влиянием мемантина не изменялась, у 11 пациентов была выявлена инвертированная реакция, т. е. увеличение агрегации, а у 2 пациентов агрегация снижалась. При исследовании влияния мемантина *in vitro* на агрегацию тромбоцитов, индуцированную адреналином, в группе из 52 больных оказалось, что у 44 пациентов агрегация тромбоцитов крови под влиянием мемантина не изменялась, у 7 пациентов была выявлена инвертированная реакция, т. е. увеличение АТ, а у 1 пациента снизилась. Иная картина была выявлена при изучении влияния препарата 5-гидроксиадамantan-2-он на агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ, *in vitro* на группе из 49 пациентов. 5-гидроксиадамantan-2-он в пробах крови 35 пациентов вызывал снижение агрегационной способности тромбоцитов, у 9 пациентов агрегация не менялась и только у 5 пациентов была выявлена инвертированная реакция тромбо-

цитов, т. е. увеличение агрегации. Таким образом, в исследованиях *in vitro* было показано, что мемантин фактически не проявляет антиагрегационную активность у пациентов с цереброваскулярной патологией, а 5-гидроксиадамantan-2-он, напротив, ингибирует агрегацию тромбоцитов.

Заключение / Conclusion

Данные, полученные на различных моделях сосудистых патологий показывают, что препараты адамантанового ряда способны предотвращать инсульт у людей с высоким риском его развития. Это потенциальное благоприятное действие может быть реализовано различными способами. Во-первых, адамантановые препараты, в частности, мемантин,

можно профилактически вводить пациентам с высоким риском цереброваскулярных заболеваний (например, с преходящей ишемической атакой, мерцательной аритмией, артериальной гипертензией, сахарным диабетом, гиперхолестеринемией и т. д.). Во-вторых, препараты из группы адамантанов можно профилактически вводить до эндоваскулярной реперфузионной терапии. Необходимо продолжать изучение эффективности адамантанов в отношении улучшения функциональных исходов после инсульта, а также в профилактических целях для обеспечения нейропротекции в случае повторного инсульта или микроинсульта. Необходимы дальнейшие исследования для определения безопасных и эффективных доз вышеперечисленных препаратов и оптимального времени их введения пациентам с инсультом.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Абаимов Денис Александрович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: abaidenis@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6888-3223>

SPIN-код: 7548-0933

к. б. н., с. н. с. лаборатории гемореологии, гемостаза и фармакокинетики с клинической и лабораторной диагностикой, ФГБНУ НЦН, Москва, Россия

Шабалина Алла Анатольевна

e-mail: ashabalina@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7393-0979>

SPIN-код: 9414-9068

к. м. н., заведующая лабораторией гемореологии, гемостаза и фармакокинетики с клинической и лабораторной диагностикой, ФГБНУ НЦН, Москва, Россия

Abaimov Denis A.

Corresponding author

e-mail: abaidenis@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6888-3223>

SPIN code: 7548-0933

PhD in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Hemorheology, Hemostasis and Pharmacokinetics with clinical and laboratory diagnostics, RCN, Moscow, Russia

Shabalina Alla A.

e-mail: ashabalina@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7393-0979>

SPIN code: 9414-9068

PhD in Medicine, Head of the Laboratory of Hemorheology, Hemostasis and Pharmacokinetics with clinical and laboratory diagnostics RCN, Moscow, Russia

Список литературы / References

- Fort RC, Schleyer PvR. Adamantane: consequences of the diamondoid structure. *Chemical Reviews*. 1964;64(3):277–300. DOI: 10.1021/cr60229a004.
- Hu Y, Sinnott SB. A molecular dynamics study of thin-film formation via molecular cluster beam deposition: effect of incident species. *Surface Science*. 2003;526(3):230–242. DOI: 10.1016/S0039-6028(03)00005-0.
- Bauer L, Khullar K. Carbon-sulfur cleavage of 1-adamantyl sulfides. *The Journal of Organic Chemistry*. 1971;36(20):3038–3040. DOI: 10.1021/jo00819a029.
- Halimehjani AZ, Marjani K, Ashouri A, Amani V. Synthesis and characterization of transition metal dithiocarbamate derivatives of 1-aminoadamantane: crystal structure of (N-adamantylidithiocarbamate) nickel (II). *Inorganica Chimica Acta*. 2011;373(1):282–285. DOI: 10.1016/j.ica.2011.02.089.
- Landa S, Hala S. Über adamantan und dessen derivate III. Über eine neue isolierungsweise des adamantans und die darstellung neuer adamantanhomologe. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1959;24(1):93–98. DOI: 10.1135/cccc19590093.
- von R Schleyer P. A simple preparation of adamantane. *Journal of the American Chemical Society*. 1957;79(12):3292–3292. DOI: 10.1021/ja01569a086.
- Davies W, Grunert R, Haff R et al. Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Science*. 1964;144(3620):862–863. DOI: 10.1126/science.144.3620.862.
- Морозов И.С., Петров В.И., Сергеева С.А. Фармакология адамантанов. Волгоград: Волгоградская мед академия; 2001:195. [Morozov IS, Petrov VI, Sergeeva SA. Farmakologiya adamantanov. Volgograd: Volgogradskaya med akademiya; 2001. (In Russ).].
- Liu C, Lin N, Wu B, Qiu Y. Neuroprotective effect of memantine combined with topiramate in hypoxic–ischemic brain injury. *Brain research*. 2009;1282:173–182. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.05.071.
- Watanabe T, Iwasaki K, Takasaki K et al. Dynamin 1 depletion and memory deficits in rats treated with Aβ and cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2010;88(9):1908–1917. DOI: 10.1002/jnr.22346.
- Wroge CM, Hogins J, Eisenman L, Mennerick S. Synaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death. *J Neurosci*. 2012;32(19):6732–6742. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6371-11.2012.

12. Dogan A, Eras M, Rao VR, Dempsey RJ. Protective effects of memantine against ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Acta Neurochir (Wien)*. 1999;141(10):1107–1113. DOI: 10.1007/s007010050491.
13. Montagne A, Hébert M, Jullienne A et al. Memantine improves safety of thrombolysis for stroke. *Stroke*. 2012;43(10):2774–2781. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.669374.
14. Chen B, Wang G, Li W et al. Memantine attenuates cell apoptosis by suppressing the calpain-caspase-3 pathway in an experimental model of ischemic stroke. *Exp Cell Res*. 2017;351(2):163–172. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.12.028.
15. Kilic U, Yilmaz B, Reiter RJ, Yüksel A, Kilic E. Effects of memantine and melatonin on signal transduction pathways vascular leakage and brain injury after focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*. 2013;237:268–276. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.059.
16. Cho G-S, Lee J-C, Ju C, Kim C, Kim W-K. N-Methyl-D-aspartate receptor antagonists memantine and MK-801 attenuate the cerebral infarct accelerated by intracorpore callosus injection of lipopolysaccharides. *Neurosci Lett*. 2013;538:9–14. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.01.031.
17. Marvanová M, Lakso M, Pirhonen J, Nawa H, Wong G, Castrén E. The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Mol Cell Neurosci*. 2001;18(3):247–258. DOI: 10.1006/mcne.2001.1027.
18. Tozzi A, Costa C, Di Filippo M, et al. Memantine reduces neuronal dysfunctions triggered by *in vitro* ischemia and 3-nitropropionic acid. *Exp Neurol*. 2007;207(2):218–226. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.06.008.
19. Гарибова Т.Л., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Кузнецова А.Л., Кульчиков А.Е., Алесенко А.В. Особенности действия мемантина на моделях холинергического дефицита и интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта) в опытах на крысах. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008;71(2):8–13. [Garibova TL, Voronina TA, Litvinova SA, Kuznetsova AL, Kul'chikov AE, Alesenko AV. Features of memantine action profile in cholinergic deficit and intracerebral posttraumatic hematoma (hemorrhagic stroke) models in rats. *Éksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2008;71(2):8–13. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2008-71-2-8-13.
20. el Nasr MS, Peruche B, Roßberg C, Mennel H-D, Kriegelstein J. Neuroprotective effect of memantine demonstrated *in vivo* and *in vitro*. *Eur J Pharmacol*. 1990;185(1):19–24. DOI: 10.1016/0014-2999(90)90206-1.
21. Block F, Schwarz M. Memantine reduces functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 1996;208(1):41–44. DOI: 10.1016/0304-3940(96)12545-3.
22. Babu CS, Ramanathan M. Pre-ischemic treatment with memantine reversed the neurochemical and behavioural parameters but not energy metabolites in middle cerebral artery occluded rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;92(3):424–432. DOI: 10.1016/j.pbb.2009.01.010.
23. Gascón S, Sobrado M, Roda JM, Rodríguez-Pena A, Díaz-Guerra M. Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Mol Psychiatry*. 2008;13(1):99–114. DOI: 10.1038/sj.mp.4002017.
24. Song J, Cheon SY, Lee WT, Park KA, Lee JE. PKA inhibitor H89 (N-[2-p-bromocinnamylamino-ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide) attenuates synaptic dysfunction and neuronal cell death following ischemic injury. *Neural Plast*. 2015;2015:374520. DOI: 10.1155/2015/374520.
25. Gu SX, Sonkar VK, Katare PB et al. Memantine Protects From Exacerbation of Ischemic Stroke and Blood Brain Barrier Disruption in Mild But Not Severe Hyperhomocysteinemia. *J Am Heart Assoc*. 2020 Feb 18;9(4):e013368. DOI: 10.1161/JAHA.119.013368.
26. Tanaka A, Ito Y, Kawasaki H et al. Effects of memantine on nitric oxide production and hydroxyl radical metabolism during cerebral ischemia and reperfusion in mice. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(6):1609–1615. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.01.014.
27. Trotman M, Vermehren P, Gibson CL, Fern R. The dichotomy of memantine treatment for ischemic stroke: dose-dependent protective and detrimental effects. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(2):230–239. DOI: 10.1038/jcbfm.2014.188.
28. Creeley C, Wozniak DF, Labruyere J, Taylor GT, Olney JW. Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J Neurosci*. 2006;26(15):3923–3932. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4883-05.2006.
29. Lapchak PA. Memantine, an uncompetitive low affinity NMDA open-channel antagonist improves clinical rating scores in a multiple infarct embolic stroke model in rabbits. *Brain Res*. 2006;1088(1):141–147. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.02.093.
30. Alulu MU, Arslan S, Acar A, Guzel A, Bahceci S, Yaldiz M. Evaluation of effects of memantine on cerebral ischemia in rats. *Neurosciences (Riyadh)*. 2008;13(2):113–116.
31. Gamdzyk M, Ziembowicz A, Bratek E, Salinska E. Combining hypobaric hypoxia or hyperbaric oxygen preconditioning with memantine reduces neuroprotection in 7-day-old rat hypoxia-ischemia. *Pharmacol Rep*. 2016;68(5):1076–1083. DOI: 10.1016/j.pharep.2016.06.009.
32. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 2014;115:157–188. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.006.
33. Wang Y-C, Sanchez-Mendoza EH, Doepfner TR, Hermann DM. Post-acute delivery of memantine promotes post-ischemic neurological recovery, peri-infarct tissue remodeling, and contralateral brain plasticity. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(3):980–993. DOI: 10.1177/0271678X16648971.
34. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(4):267–278. DOI: 10.1038/nrn3174.
35. López-Valdés HE, Clarkson AN, Ao Y, et al. Memantine enhances recovery from stroke. *Stroke*. 2014;45(7):2093–2100. DOI: 10.1161/STROKEAHA.113.004476.
36. Wang F, Liang W, Lei C et al. Combination of HBO and memantine in focal cerebral ischemia: is there a synergistic effect? *Mol Neurobiol*. 2015;52(3):1458–1466. DOI: 10.1007/s12035-014-8949-5.
37. Berthier ML, Green C, Lara JP et al. Memantine and constraint-induced aphasia therapy in chronic poststroke aphasia. *Ann Neurol*. 2009;65(5):577–585. DOI: 10.1002/ana.21597.
38. Bakhshayesh-Eghbali B, Hajjinnori M, Seyed-Saadat S-M, Seyed-Saadat S-N, Kazemnezhad-Leili E, Rouhi-Rad M. Comparing the effect of memantine and placebo on clinical outcome of intracranial hemorrhage: a randomized double blind clinical trial. *Caspian Journal of Neurological Sciences*. 2015;1(3):11–18. DOI: 10.18869/acadpub.cjns.1.3.11.
39. Kafi H, Salamzadeh J, Beladimoghadam N, Sistanizad M, Koucheh M. Study of the neuroprotective effects of memantine in patients with mild to moderate ischemic stroke. *Iran J Pharm Res*. Spring 2014;13(2):591–598.
40. Colman RW, Kuchibhotla J, Jain MK, Murray RK, Jr. Phase Separation in Phosphatidylcholine Bilayers as a Predictor of Inhibition of Blood Platelet Aggregation by Amantadines. *Biochim. Biophys. Acta*. 1997;467:273.
41. Wesemann W, Muschalek G, Stoeltzing H, Von Pusch I, Paul N. Effect of 1-aminoadamantanes on adenine nucleotide and serotonin storage in blood platelets. *Eur J Cell Biol*. 1981;26(1):158–167.
42. Donath E, Herrmann A, Coakley WT, Groth T, Egger M, Taeger M. The influence of the antiviral drugs amantadine and rimantadine on erythrocyte and platelet membranes and its comparison with that of tetracaine. *Biochem Pharmacol*. 1987;36(4):481–487. DOI: 10.1016/0006-2952(87)90355-8.
43. Kaley-Zylinska ML, Green TN, Morel-Kopp M-C et al. N-methyl-D-aspartate receptors amplify activation and aggregation of human platelets. *Thromb Res*. 2014;133(5):837–847. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.02.011.
44. El-Marasy SA, Abdel-Rahman RF, Abd-Elsalam RM. Neuroprotective effect of vildagliptin against cerebral ischemia in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2018;391(10):1133–1145. DOI: 10.1007/s00210-018-1537-x.
45. Pongkan W, Pintana H, Jaiwongkam T et al. Vildagliptin reduces cardiac ischemic-reperfusion injury in obese orchietomized rats. *J Endocrinol*. 2016;231(1):81–95. DOI: 10.1530/JOE-16-0232.
46. Mirzoyan RS, Gan'shina TS, Maslennikov DV et al. Cerebrovascular and neuroprotective effects of adamantane derivative. *Biomed Res Int*. 2014;2014:586501. DOI: 10.1155/2014/586501.
47. Танашиян М.М., Шабалина А.А., Гнедовская Е.В., Ганышина Т.С., Курза Е.В., Масленников Д.В., Мирзоян Р.С. Изучение антиагрегационного и противоишемического действия мемантина и 5-гидроксиадамantan-2-она у пациентов с цереброваскулярной патологией и в эксперименте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2016;79(2):20–23. [Tanashyan MM, Shabalina AA, Gnedovskaya EV, Gan'shina TS, Kurza EV, Maslennikov DV, Mirzoyan RS. Antiplatelet and anti-ischemic effects of memantine and 5-hydroxyadamantan-2-one in patients with cerebrovascular pathology and in experiments. *Éksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2016;79(2):20–23. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2016-79-2-20-23.

Организация фармакокинетических исследований

Мирошниченко И. И.¹, Кравцова О. Ю.²

¹ – ФГБНУ "Научный центр психического здоровья", Москва, Россия

² – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аннотация. Статья посвящена различным аспектам организации исследований фармакокинетики лекарственных средств как на доклиническом, так и клиническом уровнях (изучение биоэквивалентности, терапевтический лекарственный мониторинг, оптимизация режимов дозирования), а также обустройству работы и оснащению (оборудование, химические реактивы, помещения, персонал) фармакокинетической лаборатории.

Ключевые слова: организация исследований; фармакокинетика; биоэквивалентность; терапевтический лекарственный мониторинг; фармакокинетическая лаборатория; методы исследования

Для цитирования:

Мирошниченко И. И., Кравцова О. Ю. Организация фармакокинетических исследований. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(3):12–19. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-12-19>

Поступила: 26 ноября 2021 г. **Принята:** 02 декабря 2021 г. **Опубликована:** 15 декабря 2021 г.

Organizing of pharmacokinetic investigations

Miroshnichenko II¹, Kravtsova OYu²

¹ – FSBSI "Mental Health Research Center", Moscow, Russia

² – FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The paper is devoted to various aspects of the organization of drug pharmacokinetics research both at the preclinical and clinical levels (bioequivalence study, therapeutic drug monitoring, optimization of dosage regimens), as well as the arrangement of work and equipment (instrumentation, chemicals, premises, personnels) of the pharmacokinetic laboratory.

Keywords: research organization; pharmacokinetics; bioequivalence; therapeutic drug monitoring; pharmacokinetic laboratory; research methods

For citations:

Miroshnichenko II, Kravtsova OYu. Organizing of pharmacokinetic investigations. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(3):12–19. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-12-19>

Received: November 26, 2021. **Accepted:** December 02, 2021. **Published:** December 15, 2021

Введение / Introduction

В настоящее время фармакокинетические исследования проводятся как для поиска среди веществ-кандидатов новых лекарственных соединений, так и для изучения свойств уже апробированных лекарственных средств (ЛС). Фармакокинетика (ФК) включает в себя классическую тетраду: процессы абсорбции, распределения, метаболизма и элиминации (АРМЭ). Зачастую фармакокинетические и токсикологические исследования проводятся одновременно (АРМЭТ).

К сожалению, вещество-кандидат с хорошей активностью *in vitro* не всегда проявляет активность *in vivo* [1]. Основные причины: токсичность, низкая биодоступность и неприемлемая длительность действия.

Причины «плохой» фармакокинетики:

- Плохая абсорбция при внесосудистом введении, в частности через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) (низкие значения концентрации препарата в крови);
- Плохая растворимость (трудности с внутрисосудистым введением, плохая абсорбция);
- Быстрый (пресистемный) метаболизм (низкие значения концентрации препарата в крови, короткий период полувыведения, высокий клиренс);
- Интенсивная билиарная экскреция (низкие значения концентрации препарата в крови, короткий период полувыведения, высокий клиренс);

- Высокая степень связывания с белками плазмы крови, связывание с эритроцитами, гидролиз ферментами плазмы крови (слабая эффективность);

- Ингибирование/активирование ферментов системы цитохрома P450 (межлекарственное взаимодействие);

- Плохая проникаемость из системного кровотока в ткани органов/органа-мишени, например, в мозг через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) (низкая эффективность или даже её отсутствие);

- Неудачная лекарственная форма (низкая относительная биодоступность в сравнении с субстанцией).

Всё это побуждает фармацевтические компании включать исследования ФК и метаболизма как часть скрининга веществ-кандидатов. Ввиду ограниченного времени на проведение исследования и наличия небольшого количества веществ-кандидатов изучение фармакокинетики проводится на 1–2 видах животных. Поэтому правильный выбор вида животных, проект будущего фармакокинетического исследования и разработка в сжатые сроки адекватного метода количественного определения вещества-кандидата становятся критическим пунктом в исследовании: перспективное соединение может быть отвергнуто из-за неправильного выбора объекта исследования, дизайна его проведения или плохого методического подхода.

После того, как вещество-кандидат отобрано для дальнейших исследований (в том числе и 1–2 фазы клинических исследований), регуляторные (контролирующие) инстанции требуют данные по метаболизму ЛС. Это особенно актуально в случае ЛС с активными метаболитами, механизм действия которых может отличаться от исходного вещества.

Задача клинической фармакокинетики — оптимизация терапии [2]. Исходя из вышесказанного, целью клинических фармакокинетических исследований является определение оптимальных режимов дозирования ЛС, оценка эффективности лекарственной терапии, выявление возможных неблагоприятных побочных реакций и терапевтический лекарственный мониторинг.

С методической точки зрения все ФК исследования можно условно разделить на 3 этапа [3]:

1. Препаративная часть.

1.1. Отбор биологического материала (включая дизайн проведения фармакокинетического эксперимента).

1.2. Предварительная обработка тест-ткани (получение сыворотки, плазмы, гомогенатов тканей).

1.3. Кодирование — система записи, обеспечивающая автоматизированную идентификацию готового продукта.

1.4. Транспортировка в аналитическую лабораторию.

1.5. Хранение до анализа.

2. Аналитическая часть.

2.1. Приготовление стандартных образцов исследуемых соединений.

2.2. Подготовка проб для анализа (осаждение белков; жидкостная, твердофазная экстракция).

2.3. Изучение связывания исследуемого соединения с белками плазмы/ сыворотки крови (метод равновесного диализа).

2.4. Инструментальный метод определения следовых количеств исследуемых соединений (иммуноанализ, ГЖХ, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрия).

2.5. Построение калибровочных кривых, расчёт значений концентрации.

3. Фармакокинетическая часть.

3.1. Расчёт необходимых для определённого исследования фармакокинетических констант и параметров (расчёт ФК параметров с использованием физиологической, компартментной или некомпартментной моделей).

3.2. Подготовка соответствующего отчёта с учётом требований контролирующих инстанций и в ряде случаев заказчика.

Документация должна быть тщательно разработана, составлена, проверена, утверждена и распределена. Она должна отвечать соответствующим положениям производства и реализации готового продукта.

Вышеприведённая схема и обуславливает требования к структуре и оборудованию стандартной фармакокинетической лаборатории или, несколько

расширяя рамки объекта исследования, биоаналитической лаборатории. Желательно наличие аккредитации Росздравнадзора. При проведении экспериментов по международной тематике оборудование и штат должны соответствовать стандартам International Organization for Standardization ISO15189, касающихся деятельности медицинских лабораторий [4]. Россию в организации представляет Федеральное агентство по техническому регулированию (Росстандарт). Для соответствия этим стандартам необходимо, в первую очередь, соблюдение правил качественной лабораторной практики (GLP), а в той части лабораторной деятельности, которая относится к клинической ФК — надлежащей клинической лабораторной практики (GCLP) [5]. Правила надлежащей лабораторной практики (GLP) формально определяются как система качества, касающаяся организационного процесса и условий, в которых ФК исследования планируются, выполняются, контролируются и регистрируются, включая составление отчётов и их архивирование [6, 7].

Стандартные операционные процедуры (СОП) — инструкции для выполнения тех или иных действий, при анализе имеют решающее значение для эффективности и валидности биоаналитических исследований. Лаборатория должна иметь СОП для всех приборов, выполняемых операций и изучаемых веществ. Организация деятельности лаборатории по СОП обеспечивает согласованность работы, качество и целостность полученных данных. Текущие СОП должны находиться на «рабочем месте» и должны быть доступны для персонала, проводящего те или иные процедуры/операции [8].

Необходимо следовать стандартам, на основе которых осуществляется планирование, проведение лабораторных исследований и написание отчётов по их итогам [9]. Следование этим правилам обеспечивает достоверность данных и точную воспроизводимость эксперимента в будущем.

Лабораторные помещения должны обеспечивать адекватные условия для проведения экспериментов и исправного функционирования лабораторного оборудования.

Необходимо неукоснительное соблюдение инструкций к приборам, прилагаемых их изготовителем, а также тестирование оборудования, контрольные измерения, поддержание чистоты, надлежащее хранение реактивов и необходимый качественный ремонт измерительной техники.

Контроль качества экспериментов. Результаты измерений должны находиться в диапазоне, указанном изготовителем для того или иного прибора или лабораторной процедуры, и контроль качества эксперимента должен подтвердить, что эти пределы соблюдены. Результаты и дата контрольных измерений должны быть протоколированы в надлежащем виде.

Полученные результаты должны быть представлены в доступной для контроля форме и храниться в

надлежащем порядке. В случае клинических исследований, информация о пациенте (или добровольце) представляется в виде клинической карты и включает в себя: дату, ФИО (инициалы или иной шифр), наименование эксперимента и препарата и результаты измерений (значения концентрации в дискретные промежутки времени).

В ФК исследованиях применяются разнообразные аналитические методы. Среди них следует упомянуть микробиологические, иммунологические (RIA, ELISE), радиоизотопные методы, полярографию, капиллярный электрофорез. Тем не менее, наиболее распространённым методом остаётся высокоэффективная жидкостная и газовая хроматография. Хроматографические подходы позволяют проводить анализ следовых количеств многокомпонентных смесей с надлежащей избирательностью и чувствительностью [10]. Поэтому дальнейшее изложение в основном ориентировано на хроматографические методы, поскольку проведение иммунологических, радиоизотопных и микробиологических методов на наш взгляд является прерогативой специализированных лабораторий.

Надо признать, что последнее утверждение разделяется не всеми, в связи с введением в биоаналитическую практику метода флуоресцентного поляризационного иммуноанализа (FPIA). Интенсивность поляризованного флуоресцентного света измеряется с помощью автоматического анализатора фирмы Abbot Laboratories [11]. Бурно развивается и позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) — наиболее информативный метод визуализации для изучения распределения препарата в органах и тканях. Для реализации возможностей метода прежде всего необходимы радиотрейсеры, биологически активные соединения, содержащие в своём составе короткоживущие ПЭТ радиоизотопы (^{11}C , ^{18}F и др.) [12].

Методы изучения классической тетрады АРМЭ / Methods of studying the classical tetrad of ADME

Абсорбция/ Absorption (проницаемость):

IAM (immobilized artificial membrane — иммобилизованная искусственная мембрана) — это фосфолипиды, связанные со стационарной фазой ВЭЖХ. Время удерживания на такой хроматографической колонке позволяет предсказывать проницаемость ЛС через клеточные мембраны. Например, время удерживания на колонке IAM.PC.DD2 (Regis Technologies) позволяет оценить прохождение ЛС через ГЭБ [13].

PAMPA (Parallel artificial membrane permeability assay — параллельный анализ проницаемости искусственной мембраны) — модель исследования пассивной диффузии ЛС, представляет собой метод, который определяет проницаемость веществ из донорского отсека через искусственную мембрану с введением липидов в акцепторный отсек. В начале теста ЛС добавляется в донорский отсек, а акцепторный отсек не содержит

изучаемых веществ. После инкубационного периода, который может включать перемешивание, в каждом отсеке измеряют количество ЛС. Соотношение количества ЛС в отсеках позволяет оценить пассивную диффузию вещества через полупроницаемую мембрану (коммерческие наборы для проведения PAMPA: PAMPA Evolution™, PAMPA Explorer™ от pION Inc., AperW™ от Analiza Inc., MultiScreen PAMPA™ от Millipore) [13].

Модель клеточного монослоя / Cell Monolayer model — исследование пассивной диффузии, активного транспорта, эффлюкса (например, с гликопротеином Р) и пристеночного метаболизма, имеющего место в кишечнике. На линии клеток Caco-2 — карциномы толстой кишки человека, которые морфологически и функционально сходны с эпителием кишечника и применяются для оценки прохождения сквозь мембраны и абсорбции в ЖКТ. Инструменты и наборы для измерения прохождения через монослой клеток линии CaCo-2 широко представлены на рынке: Transwell™ (Corning), MultiScreen Caco-2™ (Millipore), BioCoat™ (BD Biosciences), Caco-2 Assay Kits (*In Vitro* Technologies).

Распределение / Distribution

В соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому исследованию ЛС, распределение изучают после однократного введения вещества лабораторным животным с последующим определением его в органах и тканях (различающихся по степени васкуляризации, в предполагаемых органах-мишенях, органах выделения) и расчётом коэффициентов распределения плазма крови /ткань [14].

Метаболизм / Metabolism

Изучение метаболизма *in vitro* проводят на модели различных фракций печени животных и человека (гепатоциты, S9 фракция, микросомы, супермикс — смесь изоферментов CYP, другие индивидуальные метаболические изоферменты). Фирмы поставщики этих фракций — BD Gentest, XenoTech, *In Vitro* Technologies, Invitrogen, Sigma-Aldrich, ADMET Technologies. S9 фракция печени содержит микросомы ретикулума и цитозоль клеток с основными ферментами как первой, так и второй фазы метаболизма, поэтому чаще всего используется при изучении биотрансформации ЛС.

In vivo поиск предполагаемых метаболитов осуществляют в биологических жидкостях (плазма крови, моча) животных после введения внутрь им исследуемого ЛС. В таких исследованиях (при наличии стандартных образцов метаболитов) для последних рассчитывают фармакокинетические параметры, в том числе и степень превращения ЛС в метаболиты.

Также изучают стабильность в плазме крови животных и человека.

Экскреция / Excretion — измерения содержания препарата в продуктах выделения (кал, моча).

Персонал / Staff

Лаборатория должна быть адекватно укомплектована квалифицированным персоналом. Обязанности сотрудников должны быть ясно сформулированы, и круг ответственности за ту или иную процедуру должен быть очерчен. Сюда можно отнести подготовку проб для анализа, работу на приборах и поддержка нормального функционирования оборудования, расчёт значений концентраций исследуемых веществ и фармакокинетических параметров, взаимодействие с клиницистами, заказ необходимых расходных средств и реактивов, поддержку чистоты лабораторной посуды и помещения, планирование эксперимента и подготовка отчётной документации. Следует признать необходимость того, что все сотрудники должны быть осведомлены о цели планируемых исследований и быть в курсе текущего положения дел [15].

На наш взгляд примерный состав подразделения может быть следующим:

- руководитель;
- лабораторный супервайзер с опытом проведения фармакокинетических исследований;
- технический супервайзер (инженер по оборудованию);
- специалист по GLP (QA);
- операторы на: хроматомакс-спектрометр (желательно две системы), ВЭЖХ, ГЖХ, автоматизированную систему обработки проб;
- специалист по рутинной пробоподготовке;
- 2 лаборанта;
- статистик.

Лабораторные помещения / Laboratory facilities

Рабочие помещения лаборатории должны иметь достаточно места, чтобы не создавать помех для работы или безопасности сотрудников. Температура и влажность лабораторного помещения должны поддерживаться в пределах допусков, установленных изготовителем оборудования. Возможность резких температурных перепадов и воздушных потоков в помещении, где находится высокочувствительное лабораторное оборудование, должна быть совершенно исключена. Все этажи, стены, потолки и столешницы лаборатории должны быть чистыми и ухоженными. Измерительные приборы должны иметь адекватное заземление. В том случае если тестируемые соединения и химические реактивы требуется хранить при низких плюсовых температурах, соответствующий холодильник должен поддерживать температуру 2–8 °С. Запрещается использовать этот холодильник для бытовых целей. Если при исследовании применяются биоактивные или представляющие опасность для здоровья материалы, они должны быть снабжены соответствующими этикетками. Следует контролировать температуру холодильника ежедневно, чтобы гарантировать со-

хранность реактивов. Если обслуживание прибора или СОП предусматривает использование дистиллированной или деионизированной воды, наличие адекватного источника обязательно.

В целом можно предусмотреть наличие следующих помещений для успешной деятельности лаборатории [3]:

1. Аналитическая комната.

Вытяжной шкаф здесь не предусматривается, но необходима проточная вентиляция и, возможно, кондиционер. При необходимости производственные помещения должны быть оборудованы системой кондиционирования приточного воздуха, которая должна:

- обеспечивать соответствующую степень очистки воздуха от механических частиц и микроорганизмов;
- автоматически регулировать климатические параметры (температуру и относительную влажность воздуха) для создания наиболее благоприятных условий для технологического процесса и обслуживающего персонала.

2. Помещение для подготовки проб к анализу.

Необходимо наличие 2 вытяжных шкафов, причём один с подведённой водой и мойкой: для фильтрации подвижной фазы и выпаривания проб.

3. Комната для хранения реактивов и поставляемых проб.

Должна быть оборудована средствами противопожарной безопасности.

4. Комната для обработки данных.

5. Помещение для персонала лаборатории.

Оборудование / Equipment

1. Препаративная часть:

- морозильная камера (–80 °С);
- холодильник (2–8 °С) с морозильной камерой (–20 °С);
- пробирки для получения плазмы/сыворотки крови;
- центрифуга (до 15 000 г) с холодильником и сменным ротором;
- полипропиленовые пробирки (контейнеры) для перевозки образцов;
- сосуды Дьюара (термосы) для перевозки образцов.

2. Аналитическая часть.

2.1. Приготовление стандартных образцов исследуемых соединений:

- аналитические весы (0,0001 г);
- автоматические пипетки, типа Eppendorf, Finpipette (20–100, 50–200, 200–1000, 1000–5000 мкл) и соответствующие наконечники к ним;
- шприцы Hamilton (25, 50, 100, 200 мкл);
- магнитная мешалка;
- химические бюксы, стаканы и пробирки для рабочих разведений;
- холодильник (2–8 °С) с морозильной камерой (–20 °С);

– спектрофотометр в UV-Vis диапазоне для снятия спектральных характеристик, в случае необходимости.

2.2. Подготовка проб для анализа

Жидкостная экстракция:

- аналитические весы (0,001 г);
- pH-метр;
- миксер типа Vortex;
- горизонтальный реципрокный встряхиватель;
- центрифуга (до 15000 г) с холодильником и сменным ротором;
- настольная центрифуга (bench type) до 8000 об/мин;
- водяная баня (термостат) с терморегулятором для выпаривания образцов в токе азота. Предпочтительно использование специальных устройств для выпаривания (к примеру, N-EVAP, Nitrogen Evaporator, производства фирмы Organomation Assoc; Shrewsbury, MA);
- азот в баллонах или в подведённой линии от генератора азота;
- соответствующие разного объёма химически инертные пробирки для культур и центрифужные пробирки с герметическими крышками и тефлоновой или политетрафлуорэтиленовой подкладкой.

– ультразвуковая баня.

Твёрдофазная экстракция:

- вакуумный насос;
- мембраны для твёрдофазной экстракции (например, Empore octyl solid-phase extraction membranes (Analytichem International, Harbor City, CA, U.S.A.);
- патроны для твёрдофазной экстракции (Sola columns (Thermo) или Oasis cartridges (Waters));
- Вакуумный манифолд (Vac-Elut vacuum manifold или Waters vacuum manifold);
- наиболее целесообразно (но дорого!) применение роботизированных систем пробоподготовки: Tekan, Hamilton Robotic instrumentation; Co-Sense for LC-MS (Shimadzu).

2.3. Равновесный диализ

Одним из процессов, рассматриваемых при изучении ФК лекарственных веществ, является связывание с белками плазмы крови (альбумин, α -1 кислый гликопротеин, β -глобулины). Для оценки связывания лекарственного вещества с белками плазмы крови традиционно применяется метод равновесного диализа. Этот метод также применяется для *in vitro* оценки прохождения ЛС через ГЭБ. Современным вариантом проведения метода равновесного диализа являются наборы: фирмы Pierce – Rapid Equilibrium Dialysis Device (RED) и фирмы HTDialysis, LLC – Reusable 96-well Micro-Equilibrium Dialysis Device HTD 96.

В качестве дополнительного оборудования помимо диализных наборов также требуется:

- планшетный термошейкер-инкубатор.
- миксер типа Vortex.
- промывалки.
- многоканальные пипетки 0,2–10 и 50–1200 мкл, соответствующие наконечники к ним.
- шкаф для хранения реактивов.

– металлический шкаф для хранения легковоспламеняющихся жидкостей (ЛВЖ).

2.4. Инструментальные методы определения

2.4.1. ИФА

Иммуноферментный анализ (ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) – рутинный иммунологический метод количественного определения как низкомолекулярных соединений, так и макромолекул, в основе которого лежит специфическая реакция антиген–антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. Метод ИФА обеспечивает простоту, чувствительность в диапазоне пикограммов, но, как и все методы, основанные на иммуноанализе, ограничен селективностью антитела [16]. Главными достоинствами методов ИФА и ВЭЖХ-МС-МС являются возможность автоматизации (ИФА) и быстрый переход с одного вида анализа на другой при ВЭЖХ-МС-МС. К числу недостатков следует отнести перекрестные реакции в ИФА, ионную супрессию и матричный эффект в ВЭЖХ-МС-МС [17].

2.4.2. Хроматография

Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ:

- деионизованная вода: система типа Milli-Q system/ Водoley;
- система для фильтрации фазы;
- фильтры (например, нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм; Rainin, США);
- система для дегазации фазы под вакуумом или в присутствии инертного газа;
- ультразвуковая баня;
- аналитические весы (0,0001 г);
- pH- метр.

LC-MS-MS

Можно констатировать, что в настоящее время наличие хромато-масс-спектрофотометрического оборудования является совершенно необходимым атрибутом успешной жизнедеятельности фармакокинетической лаборатории [18]. Причём наблюдается тенденция вытеснения сочленения масс-детекторов с газовыми хроматографами жидкостной хроматографией с тандемной детекцией. Детектор (масс-спектрометр) должен быть класса TQMS – трёхквadrupольный масс-спектрометр (triple quadrupole mass spectrometer) или Q-TOF – сочетание квадруполь с времяпролётным анализатором (quadrupole time-of-flight), или типа орбитальная ионная ловушка (orbitrap) [19]. Последние из упомянутых (Q-TOF, Orbitrap) являются масс-спектрометрами высокого разрешения и необходимы для расчёта точных масс ЛС и их структурных фрагментов, и тем самым позволяют повысить точность их идентификации. При наличии у ЛС метаболитов, близких по структуре, анализаторы высокого разрешения позволяют не прибегать к сложному и длительному по времени хроматографическому разделению этих метаболитов [20].

Детекторы

Основными производителями масс-спектрометров являются Sciex, Agilent, Thermo, Waters, Shimadzu. Список далеко не полный. Все они обладают вполне приемлемыми характеристиками и выбор, в значительной мере, носит произвольный характер.

Система ВЭЖХ для сочленения с масс-спектрометром

В настоящее время все вышеуказанные фирмы имеют и собственные разработки как жидкостных, так и газовых хроматографов.

ВЭЖХ

Автоматизированная градиентная система, включающая в себя:

- 2–3 насоса;
- смеситель низкого давления;
- вакуумный дегазатор in-line;
- термостат для колонки;
- термостатируемый автосамплер (с набором виал или плашечного формата);
- системный контролер;
- спектрофотометрический детектор в UV-Vis диапазоне, в качестве альтернативы детектор с диодной матрицей (DAD);
- флуориметрический детектор;
- электрохимический детектор.

3. Фармакокинетическая часть

3.1. Расчёт фармакокинетических параметров

Персональный компьютер с необходимой периферией (принтер, сканер) и с набором соответствующего программного обеспечения: WinNonlin, Kinetika – анализ ФК параметров при однократном и/или многократном введении, биоэквивалентность;

NONMEM, NPEM, MONOLIX – популяционный ФК анализ.

Химические реактивы

Reagents

Все реагенты и растворы в лабораторных помещениях должны быть маркированы с указанием идентичности, титра или концентрации, требований к хранению и срока годности. При хранении в одном шкафу целесообразно соблюдать «правило трёх полок: на верхней полке располагаются кислоты, на средней – соли и внизу – основания. Авторы прекрасно представляют себе условия закупки необходимых для проведения экспериментов реактивов. Тем не менее, следует избегать излишнего накопления запасов органических растворителей, как правило, представляющих собой ЛВЖ. Особые условия необходимо соблюдать при хранении метанола: металлический шкаф, ключ от которого хранится у уполномоченного лица (лаборанта).

Необходимо обеспечить правильное и безопасное хранение отходов производства, подлежащих уничтожению, и мусора. Их следует помещать в специальные промаркированные ёмкости. Токсические вещества и горючие материалы следует хранить в пригодных для этих целей, промаркированных, закрытых ёмкостях.

Ёмкости с отходами следует ежедневно выносить в специально отведённые места вне производственных зданий, а их содержимое следует регулярно вывозить на переработку или утилизацию.

Кислоты и основания: борная, муравьиная, хлористоводородная, перхлорная, ортофосфорная, серная, уксусная, трихлоруксусная, трифторуксусная кислоты, гидроксиды калия, натрия, аммония.

Растворители: ацетон, ацетонитрил, бензол, 1-бутанол, n-бутил хлорид, хлороформ, дихлорметан, дихлорметилсилан, диэтиловый эфир, диоксан, этанол (в том числе абсолютный), этиловый эфир уксусной кислоты, формальдегид, n-гексан, n-гептан, изоамиловый спирт, изопропиловый спирт, метанол, метил-трет-бутиловый эфир, n-пентан, 2-пропанол, тетрагидрофуран, толуол.

Особенности использования реактивов для ВЭЖХ-МС – приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ-МС имеет свои специфические черты, связанные с детекцией. Дело в том, что кроме общих для традиционной ВЭЖХ проблем, связанных с интерференцией съвороточных пиков, для масс-спектрометров наблюдается феномен значительного уменьшения величины хроматографического сигнала вследствие ионизации самой подвижной фазы. В связи с этим не используются многие широко распространённые подвижные фазы, в частности категорически противопоказано использование фосфатных буферов [21]. Фактическим стандартом для ВЭЖХ-МС являются градиентные смеси буфера ацетата/формиата аммония с органически модификатором (ацетонитрилом или метанолом). Мы рекомендуем по возможности использовать летучие смеси 0,1–0,2 % муравьиной кислоты и органического модификатора для лучшей работы. Необходимо избегать попадания нелетучих буферов в МС детектор, так как из-за этого внутри источника ионов – в транспортном капилляре и в отверстии для спрея – могут образовываться соли. Растворы летучих буферов, способствующих ионизации нейтральных молекул, могут включать в себя следующие вещества: уксусная кислота, аммония ацетат, аммония формиат, аммония гидроксид, триэтиламин, трифторуксусная кислота.

Соли: аммония ацетат, аммония бикарбонат, аммония фосфат, аммония сульфат, калия фосфат одно- и двухзамещённый, натрия фосфат одно- и двухзамещённый, натрия ацетат, натрия борат, натрия карбонат и бикарбонат, натрия хлорид, Na₂EDTA, натрия сульфат, Tris-HCl.

Ионопарные реагенты и модификаторы: диэтиламин, триэтиламин, натрия 1-октансульфонат, натрия додецилсульфат (SDS), гексадецилтриметиламмония бромид, тетрабутиламмония гидроксид, натрия 1-гептансульфонат. Следует констатировать, что анализ на ВЭЖХ-МС системе позволяет во многих случаях обходиться без трудоёмких процедур дериватизации исходного вещества [22].

Деятельность стандартной фармакокинетической лаборатории, устроенной и оснащённой по вышеописанной схеме, направлена на проведение следующих исследований:

- доклиническая (экспериментальная) фармакокинетика, неклиническая по терминологии зарубежных авторов;
- качественный и количественный анализ, в том числе и метаболизма ЛС;
- клиническая фармакокинетика;
- биоэквивалентность;
- терапевтический лекарственный мониторинг.

Необходимо подчеркнуть, что фармакокинетическая лаборатория выполняет, в основном сервисные функции [23]. В этом смысле она выполняет заказы от производителей лекарств и лечебных учреждений. Из этого вытекает, что подобные лаборатории являются, как правило, структурной частью фармацевтических фирм, крупных лечебных центров или государственных контролирующих организаций.

В чисто исследовательском плане деятельность фармакокинетической лаборатории включает в себя изучение клинической фармакокинетики, метаболизма ЛС [24]. Всё большую популярность приобретает популяционный метод: данные, полученные от большого числа пациентов, инкорпорируются в целостную выборку. Значения концентрации в дискретные интер-

валы времени у различных пациентов объединяются и подвергаются соответствующему программному анализу, хотя количество пробоотборов у отдельного индивидуума может быть равным единице [25].

В случае более широкого спектра исследований проводится анализ содержания эндогенных биологически активных веществ (биогенные амины, аминокислоты, простагландины, гормоны, витамины). Особую актуальность имеет измерение содержания в организме биомаркеров, которые представляют собой очень чувствительные и определённые индикаторы болезней [26]. Диагностические тесты на основе биомаркеров предполагается использовать для повышения точности диагностики, мониторинга прогрессирования заболевания, для определения вариантов лечения и ответа на терапию. Обнаружение и валидация таких молекул может стать основой для создания дополнительных параклинических методов диагностики заболеваний, либо поспособствовать созданию таргетных мишеней для индивидуализации фармакотерапии, что является одной из важных задач современной фундаментальной медицины.

С методической точки зрения одной из задач лаборатории является создание свода валидированных, качественных методик количественного определения лекарственных и иных, представляющих клинический интерес, средств.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мирошниченко Игорь Иванович

e-mail: igormir@psychiatry.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>

SPIN-код: 4117-9703

д. м. н., заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ НЦПЗ, Москва, Россия

Miroshnichenko Igor I.

e-mail: igormir@psychiatry.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>

SPIN code: 4117-9703

Dr. Sci. (Med.), Head of pharmacokinetics laboratory MHRC, Moscow, Russia

Кравцова Оксана Юрьевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: oukravtsova@yahoo.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>

SPIN-код: 1733-2330

к. б. н., н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kravtsova Oxana Yu.

Corresponding author

e-mail: oukravtsova@yahoo.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>

SPIN code: 1733-2330

PhD in Biology, Researcher scientist of pharmacokinetics laboratory FSBI «Zakusov institute of pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Guan L, Yang H, Cai Y, et al. ADMET-score – a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. *Medchemcomm*. 2018;10(1):148–157. DOI: 10.1039/c8md00472b.
2. Gabrielson J, Weiner D. Non-compartmental Analysis. *Methods Mol Biol*. 2012; 929:377–389. DOI: 10.1007/978-1-62703-050-2-16.
3. Мирошниченко И.И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. – Москва: Медицинское информационное агентство; 2011. – 416 с. [Miroshnichenko II. Rational dosing and monitoring of medicines. Moscow: Medical Information Agency 2011. (In Russ).].
4. Schneider F, Maurer C, Friedberg RC. International Organization for Standardization (ISO) 15189. *Ann Lab Med*. 2017;37(5):365–370. DOI: 10.3343/alm.2017.37.5.365.
5. Ezzelle J, Rodriguez-Chavez IR, Darden JM et al. Guidelines on good clinical laboratory practice: Bridging operations between research and clinical research laboratories. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;46(1):18–29. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.10.010.
6. Ito K, Someya H. Good Laboratory Practice: Initial Development, Necessity, and Issues of Data Reliability in Basic Research. *Yakugaku Zasshi*. 2019;139(6):875–879. DOI: 10.1248/yakushi.18-00193-1.
7. Селезнева А.И., Смирнов В.А., Горячкин В.В., Чадова Н.Н., Поляков С.В., Шестаков В.Н., Абрамович Р.А. Интегрированная модель системы менеджмента качества лабораторных исследований лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):148–165. [Selezneva A.I, Smirnov VA, Goryachkin VV, Chadova NN, Polyakov SV, Shestakov VN, Abramovich RA. The integrated model of quality management system of laboratory studies of medicines. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(3):148–165. (In Russ).]. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-148-165.
8. Buonarati MH, Schoener D. Investigations beyond standard operating procedure on internal standard response. *Bioanalysis*. 2019;11(18):1669–1678. DOI: 10.4155/bio-2019-0187.
9. Summerfield S, Hayes R, Liang M et al. The business of bioanalysis: new technology integration into bioanalytical workflows. *Bioanalysis*. 2018;10(22):1775–1779. DOI: 10.4155/bio-2018-0269.
10. van Andel L, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH. Review of Chromatographic Bioanalytical Assays for the Quantitative Determination of Marine-Derived Drugs for Cancer Treatment. *Mar Drugs*. 2018;6(7):246. DOI: 10.3390/md16070246.
11. Glahn-Martínez B, Benito-Peña E, Salis F et al. Sensitive rapid fluorescence polarization immunoassay for free mycophenolic acid determination in human serum and plasma. *Anal. Chem*. 2018;90(8):5459–5465. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00780.
12. Weinstein EA, Liu L, Ordóñez AA et al. Noninvasive Determination of 2-[18F]-Fluoroisonicotinic Acid Hydrazide Pharmacokinetics by Positron Emission Tomography in Mycobacterium tuberculosis-Infected Mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(12):6284–6290. DOI:10.1128/AAC.01644-12.
13. Kerns EH and Di L. Drug-like properties: concepts, structure design, and methods: from ADME to toxicity optimization. – Academic Press (is an imprint of Elsevier); 2008.
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая./ Миронов А.Н. (гл. ред.) – М.: Гриф и К; 2013. – 944 с. [Rukovodstvo po provedeniiu doclinesheskih issledovaniy lekarstvennykh sredstv. First part. Ed by Mironov AN. Moscow: Grif i K; 2013. (In Russ).].
15. Rosenthal WM. Establishing a pharmacy-based laboratory service. *J Am Pharm Assoc (Wash)*. Mar-Apr 2000;40(2):146–152, 154–156; quiz 321–323.
16. Konstantinou GN. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 2017;1592:79–94. DOI: 10.1007/978-1-4939-6925-8-7.
17. Brandhorst G, Oellerich M, Maine G et al. 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.
18. Мирошниченко И.И., Шилов Ю.Е. Анализ биологических образцов в современной лабораторной практике (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):115–120. [Miroshnichenko II, Shilov YE. Analysis of Biological Samples in a Contemporary Laboratory Practice (Review). *Drug development & registration*. 2019;8(2):115–120. (In Russ).]. DOI: 10.33380/23052066-2019-8-2-115-120.
19. Хохлов А.Л., Рыска М., Кукес В.Г. и др. Теоретические и практические основы проведения исследований воспроизведенных лекарственных препаратов. – Москва-Ярославль-Прага: ООО Фотолайф; 2017. – 227 с. [Hohlov AL, Ryska M, Kukes VG et al. Theoretical and practical bases of research of reproduced drugs. Moscow-Praga-Yaroslavl: Photolife LLC; 2017. (In Russ).].
20. Макаров А. Масс-спектрометры Thermo Fisher Scientific. ORBITRAP – 10 лет прогресса. *Аналитика*. 2016;5(30):22–37. [Makarov A. Mass spectrometers Thermo Fisher Scientific. ORBITRAP – 10 years of progress. *Analytics*. 2016;5(30):22–37. (In Russ).] URL: <https://www.j-analytics.ru/journal/article/5675>. Ссылка активна на: 04.11.2021
21. Tan A, Fanaras JC. Use of high-pH (basic/alkaline) mobile phases for LC-MS or LC-MS/MS bioanalysis. *Biomed Chromatogr*. 2019;33(1):e4409. DOI: 10.1002/bmc.4409.
22. Armstrong M, Jonscher K, Reisdorph NA. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2007;21(16):2717–2726. DOI: 10.1002/rcm.3124.
23. Жердев В.П., Литвин А.А. Роль и организация фармакокинетических исследований. *Клиническая фармакокинетика*. 2005;2(3):1–3. [Zherdev VP, Litvin AA. The role and organization of pharmacokinetic research. *Clinical pharmacokinetics*. 2005;2(3):1–3. (In Russ).].
24. Кукес В.Г. Клиническая фармакокинетика: теоретические, прикладные и политические аспекты. – М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. – 432 с. [Kukes VG. Clinical pharmacokinetics: theoretical, applied and political aspects. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (In Russ).].
25. Sturkenboom MGG, Märtson A-G, Svensson EM et al. Population Pharmacokinetics and Bayesian Dose Adjustment to Advance TDM of Anti-TB Drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2021; 60(6):685–710. DOI: 10.1007/s40262-021-00997-0.
26. Capecchi R, Puxeddu I, Prates F, Migliorini P. New biomarkers in SLE: from bench to bedside. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(Suppl.5):v12–v18. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa484.

Влияние фенибута и атомоксетина на биосинтез и метаболизм дофамина и серотонина в мозге мышей C57BL/6

Сухорукова Н. А., Кудрин В. С., Наркевич В. Б., Ковалёв Г. И.

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

Аннотация. Методом ВЭЖХ/ЭД изучено влияние внутривентрикулярного введения ноотропного средства фенибута (70 мг/кг) и атомоксетина гидрохлорида (3 мг/кг) на нейрохимические показатели дофамин- и серотонинергических систем в структурах мозга мышей C57BL/6. Установлено, что в условиях *in vivo* блокады декарбоксилазы L-ароматических аминокислот (ДААК) оба препарата в выбранных дозах не оказывали прямого действия на процессы биосинтеза как дофамина, так и серотонина в префронтальной коре и стриатуме грызунов. Обнаруженные эффекты фенибута и атомоксетина гидрохлорида в сравнении с использованными лигандами D₂-рецепторов квинпиролом (0,1 мг/кг) и сульпиридом (25 мг/кг) позволяют предположить отсутствие прямого участия в них дофаминовых ауторецепторов, регулирующих функциональную активность дофаминергических синапсов.

Ключевые слова: фенибут; атомоксетин; биосинтез дофамина и серотонина; префронтальная кора; стриатум; мыши C57BL/6; ВЭЖХ/ЭД

Для цитирования:

Сухорукова Н. А., Кудрин В. С., Наркевич В. Б., Ковалёв Г. И. Влияние фенибута и атомоксетина на биосинтез и метаболизм дофамина и серотонина в мозге мышей C57BL/6. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(3):20–25. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-20-25>

Поступила: 26 ноября 2021 г. **Принята:** 02 декабря 2021 г. **Опубликована:** 15 декабря 2021 г.

Effect of phenibut and atomoxetine on the biosynthesis and metabolism of dopamine and serotonin in the brain of C57BL/6 mice

Sukhorukova NA, Kudrin VS, Narkevich VB, Kovalev GI

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The effect of intraperitoneal administration of the nootropic drug phenibut (70 mg/kg) and atomoxetine hydrochloride (3 mg/kg) on the neurochemical parameters of dopaminergic and serotonergic systems in the brain structures of C57BL/6 mice was studied by HPLC/ED. It was found that under *in vivo* blockade of L-aromatic amino acid decarboxylase (DAAA), both drugs in the selected doses did not affect directly on biosynthesis processes of both dopamine and serotonin in the prefrontal cortex and striatum of rodents. The observed effects of phenibut and atomoxetine hydrochloride, in comparison with the used D₂ receptor ligands quinpirole (0.1 mg/kg) and sulpiride (25 mg/kg), suggest the absence of direct participation of dopamine autoreceptors regulating the functional activity of dopaminergic synapses.

Keywords: phenibut; atomoxetine; dopamine and serotonin biosynthesis; prefrontal cortex; striatum; C57BL/6 mice; HPLC/ED

For citations:

Sukhorukova NA, Kudrin VS, Narkevich VB, Kovalev GI. Effect of phenibut and atomoxetine on the biosynthesis and metabolism of dopamine and serotonin in the brain of C57BL/6 mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(3):20–25. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-20-25>

Received: November 26, 2021. **Accepted:** December 02, 2021. **Published:** December 15, 2021.

Введение / Introduction

Фенибут — препарат с ноотропным и анксиолитическим действием [1], обладает положительным влиянием на компонент внимания в клинике синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) [2] и в эксперименте [3]. В нейрохимических исследованиях было показано, что препарат изменяет параметры катехол- и индол-аминергических систем в лобной коре, гиппокампе и стриатуме мозга интактных крыс [4].

При фенотипическом моделировании дефицита внимания на аутистических мышах CD-1, при котором в радиорецепторном анализе с применением тритий-меченого (-)сульпирида была выявлена повышенная плотность (B_{max}) дофаминовых D₂-рецепторов в мембранах префронтальной коры (ПФК) мозга субпопуляции с низким индексом внимания к новым объектам [5], фенибут и препарат сравнения атомоксетин нормализовали как поведение, так и показатель рецепторного связывания [3]. В качестве регуляторов дофаминовой нейротрансмиссии D₂-ауторецепторы мо-

дулируют функцию нейронов либо прямо — через активацию калиевой проводимости, либо косвенно — посредством контроля экспрессии тирозингидроксилазы и дофаминовых транспортеров [6, 7].

Исходя из вышеизложенного, представлялась актуальной попытка связать описанные рецепторный и метаболический функциональные звенья для углубления сведений о моноаминергическом компоненте в механизме действия фенибута при дефиците внимания. Таким образом, целью настоящего исследования стало изучение методом ВЭЖХ/ЭД влияния фенибута и препарата сравнения атомоксетина, а также лигандов D₂-рецепторов сульпирида и квинпирила на метаболизм дофамин- и серотонинергических систем (биосинтез ДОФА и 5-ГТф, метаболический оборот дофамина (ДА) и серотонина (5-НТ) с образованием их основных метаболитов 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), 3-метокситирамина (3-МТ), 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) в префронтальной коре и стриатуме мозга мышей).

Материалы и методы / Materials and Methods

Эксперимент проводили на самцах мышей C57BL/6 массой 25–30 г ($n = 70$). Животных содержали в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в стандартных условиях при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и корму, по 10 особей в клетке. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33215-2014 и 33216-2014), Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Изучено влияние однократного внутривенного введения фенибута (70 мг/кг), атомоксетина (3 мг/кг), а также лигандов D_2 -рецепторов квинпиrolа (0,1 мг/кг) и сульпирида (25 мг/кг) на содержание моноаминов, их прекурсоров и метаболитов, определяемых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД) [8].

Выбор препаратов и их доз основывали на результатах экспериментов, предварительно проведённых в лаборатории радиоизотопных методов исследований. Животных разделяли на контрольную группу (0,9 % NaCl, в/б) и опытные группы, получавшие инъекции исследуемых 4 препаратов, которые вводили за 40 минут до декапитации в инъекционном объёме, соответствующем массе животного. Всем особям вводили ингибитор декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (ДААК, КФ 4.1.1.28) 3-оксибензилгидразин (NSD-1015) за 30 минут до декапитации (100 мг/кг, в/б). Эвтаназию мышей осуществляли цервикальной дислокацией с последующей декапитацией, головной мозг извлекали на леду и выделяли префронтальную кору и стриатум [9].

Выделенные структуры головного мозга мышей размельчали в гомогенизаторе «стекло–тефлон» (0,2 мм) при скорости вращения пестика 3000 об/мин. Гомогенизацию осуществляли в 0,1 N HClO₄ с добавлением в качестве внутреннего стандарта 3,4-диоксибензиламина (ДОБА) в количестве 0,5 нмоль/мл. Пробы центрифугировали при 9000 g и температуре 4 °C в течение 10 минут. Надосадочную жидкость в количестве 20 мкл фильтрата методом прямой инъекции наносили на обращенно-фазную колонку ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм, 3 мкм (Dr. Majsch GmbH, ФРГ). В качестве подвижной фазы использовали 0,1 M цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0,3 mM ионного агента октансульфоната натрия, 0,1 mM ЭДТА и 9 % ацетонитрила (pH = 3,0). Определение моноаминов осуществляли на стеклоуглеродном электроде при потенциале +0,85 В против Ag/AgCl электрода сравнения. Скорость потока подвижной фазы составляла 1,0 мл/мин при давлении 200 атм. Регистрацию образцов проводили с использованием специального про-

граммного комплекса Мультихром 1,5 (Амперсенд). Для калибровки хроматографа в качестве стандарта для определения количества веществ в структурах мозга мышей использовали смеси рабочих растворов в концентрации 0,5 нмоль/мл. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали, исходя из отношений площадей пиков в стандартном и экспериментальных образцах [8].

Анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 согласно «Методическим рекомендациям по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». На графиках представлены средние значения с учётом стандартной ошибки среднего ($\text{mean} \pm \text{SEM}$).

Результаты и обсуждение / Results and Discussion

Оценка биосинтеза ДА и 5-НТ осуществляется по уровню накопления их предшественников L-ДОФА и 5-ГТф в условиях *in vivo* блокады декарбоксилазы L-ароматических аминокислот (ДААК) с помощью стандартного ингибитора 3-оксибензилгидразина (3-ОБГ или NSD-1015). Необходимость применения 3-ОБГ обусловлена высокой интенсивностью процессов биосинтеза моноаминов, благодаря чему содержание предшественников в интактном мозге крайне низко. Блокада ДААК, прерывающая метаболическое превращение ДОФА и 5-ГТф в ДА и 5-НТ ферментами тирозингидроксилазой (ТГ, КФ 1.14.16.2) и триптофангидроксилазой (ТфГ, КФ 1.14.16.4), приводит к накоплению прекурсоров до концентраций, доступных для количественного определения [10]. В частности, в стриатуме мозга мышей C57BL/6 блокада ДААК приводила к росту концентрации ДОФА до 600 % и 5-ГТф до 160 % относительно уровней у интактных животных, что давало возможность оценивать предполагаемое влияние препаратов на активность биосинтеза ДА и 5-НТ, соответственно [11].

Известно, что D_2 -рецепторы дофамина выполняют роль регуляторов пресинаптической активности DA-ергических терминалей через воздействие на высвобождение и/или синтез нейромедиатора. Так, в условиях физиологической нормы активация ауторецепторов ДА ослабляет эти процессы, а ингибирование ускоряет их [12]. Поэтому в число препаратов для анализа возможного взаимодействия с этими рецепторами были включены агонист D_2 -рецепторов квинпиrol (0,1 мг/кг) и антагонист сульпирид (25 мг/кг) [13, 14].

Результаты влияния фенибута, атомоксетина, квинпиrolа и сульпирида на активность ТГ и ТфГ на фоне блокады ДААК представлены в табл. 1.

Сравнение результатов между группами контроля свидетельствует, что накопление ДОФА под влиянием 3-ОБГ более выражено в стриатуме (2,23 нмоль/г ткани), чем в ПФК (0,15 нмоль/г ткани), тогда как накопление 5-ГТф в обеих структурах сопоставимое (см. табл. 1).

Таблица 1

Влияние фенибута и препаратов сравнения на NSD-1015-индуцированное накопление прекурсоров биосинтеза ДА и СТ в структурах мозга мышей C57BL/6 (нмоль/г ткани, $m \pm SEM$)

Table 1

Effect of phenibut and reference drugs on NSD-1015-induced accumulation of DA and CT biosynthesis precursors in C57BL/6 mouse brain structures (nmol/g, $m \pm SEM$)

Прекурсоры биосинтеза / Precursors of Biosynthesis	Контроль (физиствор) / Control (saline)	Квинпиrol (0,1 мг/кг) / Quinpirole (0,1 mg/kg)	Сульпирид (25 мг/кг) / Sulpiride (25 mg/kg)	Фенибут (70 мг/кг) / Phenibut (70 mg/kg)	Атомоксетин (3 мг/кг) / Atomoxetine (3 mg/kg)
Префронтальная кора / Prefrontal cortex					
L-ДОФА / L-DOPA	0,15±0,01	0,21±0,02*	0,25±0,01*	0,16±0,02	0,13±0,01
5-ГТф / 5-HTp	0,93±0,12	0,31±0,02*	0,49±0,06*	0,51±0,06*	0,54±0,05*
Стриатум / Striatum					
L-ДОФА / L-DOPA	2,23±0,17	1,94±0,18#	3,11±0,31*	2,30±0,19	2,20±0,15
5-ГТф / 5-HTp	1,13±0,06	1,35±0,24	0,97±0,06	1,98±0,08	0,97±0,11

Примечания: * – статистически значимое отличие от контроля при $p < 0,05$ (U-критерий Манна–Уитни); # – тенденция к значимому отличию от контроля ($0,05 < p < 0,10$).
Notes: * – statistically significant difference from the control at $p < 0.05$ (Mann–Whitney test); # – tendency to significant difference from the control ($0.05 < p < 0.10$).

Ни фенибут (агонист ГАМК_B-рецепторов [3]), ни атомоксетин (ингибитор систем захвата НА, ДА и, в меньшей степени, 5-НТ [14]) не были эффективны в отношении накопления ДОФА в обеих структурах, что отличало их от действия антагониста D₂-рецепторов сульпирида, усиливающего аккумуляирование прекурсора биосинтеза ДА на 67 % в ПФК и на 55 % в стриатуме. Агонист D₂-рецепторов квинпиrol на фоне эффекта ингибитора ДААК также увеличивал накопление ДОФА в ПФК (+40 %, $p < 0,05$),

но в стриатуме противодействовал этому, проявляя тенденцию к уменьшению концентрации ДОФА на 13 % ($p = 0,077$) (см. табл. 1).

Поскольку ни атомоксетин [14], ни фенибут [3] не обладают существенным сродством к D₂-рецепторам, можно связать отсутствие у них эффекта на биосинтез ДА (табл. 1) с невозможностью прямого взаимодействия с ауторецепторами дофамина, доступными для сульпирида и квинпиrolа.

Таблица 2

Влияние фенибута и препаратов сравнения на показатели оборота моноаминов в мозге мышей C57BL/6 на фоне действия ингибитора ДААК (нмоль/г ткани, $m \pm SEM$)

Table 2

Effect of phenibut and reference drugs on indicators of monoamine turnover in the brain of C57BL/6 mice against the background of the action of the AADC inhibitor (nmol/g, $m \pm SEM$)

Оборот моноаминов / Monoamine turnover	Контроль (физиствор) / Control (saline)	Квинпиrol (0,1 мг/кг) / Quinpirole (0.1 mg/kg)	Сульпирид (25 мг/кг) / Sulpiride (25 mg/kg)	Фенибут (70 мг/кг) / Phenibut (70 mg/kg)	Атомоксетин (3 мг/кг) / Atomoxetine (3 mg/kg)
Префронтальная кора / Prefrontal cortex					
ДОФУК/ДА/ДОРАС/DA	0,65±0,07	0,80±0,11	0,56±0,07	1,05±0,07*	0,99±0,12*
ГВК/ДА/НВА/DA	0,59±0,05	0,69±0,08	1,11±0,11*	0,60±0,05	1,05±0,12*
5-ГИУК/5-НТ/5-Н1АА/5-НТ	0,17±0,01	0,15±0,01	0,25±0,03	0,18±0,02	0,16±0,01
Стриатум / Striatum					
ДОФУК/ДА/ДОРАС/DA	0,026±0,002	0,021±0,001#	0,033±0,002*	0,029±0,001	0,026±0,001
ГВК/ДА/НВА/DA	0,048±0,002	0,040±0,002#	0,058±0,004#	0,046±0,003	0,051±0,004
5-ГИУК/5-НТ/5-Н1АА/5-НТ	0,666±0,073	0,646±0,150	0,707±0,078	0,760±0,089	0,667±0,052

Примечания: * – статистически значимое отличие от контроля при $p < 0,05$ (U-критерий Манна–Уитни); # – тенденция к значимому отличию от контроля ($0,05 < p < 0,10$).
Notes: * – statistically significant difference from the control at $p < 0.05$ (Mann–Whitney test); # – tendency to significant difference from the control ($0.05 < p < 0.10$).

Другие различия между эффектами фенибута и атомоксетина, с одной стороны, и анализаторами дофаминовых рецепторов — с другой, представлены по их действию на метаболический оборот дофамина (табл. 2) и на тканевую уровень метаболитов (табл. 3).

Так, во-первых, величина отношения ДОФУК/ДА под воздействием фенибута и атомоксетина возрастала на 62 и 52 % в ПФК, тогда как в стриатуме эти параметры не изменялись. Напротив, квинпиrol и сульпирид не влияли на этот показатель в ПФК, но в стриатуме антагонист достоверно увеличивал его на 27 %, а агонист уменьшал на 19 % ($p = 0,065$). Во-вторых, в ткани стриатума фенибут и атомоксетин были индифферентными к показателю ГВК/ДА, тогда как квинпиrol и сульпирид проявили тенденцию к его снижению (-17% при $p = 0,09$) и к возрастанию ($+21\%$ при $p = 0,075$), соответственно.

В-третьих, фенибут и атомоксетин приводили к падению концентрации ДА в ПФК на 35 % и на 50 %, соответственно, а сульпирид и квинпиrol проявили себя неэффективными (см. табл. 3).

В-четвертых, в стриатуме лиганды ДА-рецептора в отличие от фенибута и атомоксетина уменьшали на

19 % (квинпиrol) и увеличивали на 23 % (сульпирид) содержание ДОФУК (см. табл. 3).

При этом однонаправленность эффектов всех 4 исследованных веществ на снижение в ПФК концентраций метаболитов 3-МТ и ГВК указывает на ослабление т. н. лабильного пула вновь синтезированного ДА и стабильного депо ДА, соответственно (см. табл. 3).

В отношении биосинтеза серотонина в стриатуме все 4 препарата оказались неэффективными, но в ПФК подавляли накопление 5-ГТф: квинпиrol — на 67 %, сульпирид — на 47 %, атомоксетин — на 42 %, а фенибут — на 45 %, прерывая таким образом, поступление СТ во внутриклеточный пул (см. табл. 1).

Этому соответствуют данные об отсутствии под их влиянием изменений в данной области мозга как скорости метаболического оборота СТ (см. табл. 2), так и концентраций 5-НТ и 5-ГИУК (см. табл. 3), что совпадает с результатами по влиянию фенибута (25 мг/кг, в/б, однократно) на интактных крысах [4]. Одинаковая направленность эффектов на биосинтез серотонина столь разных по механизму действия веществ, указывает на их косвенный путь воздействия, возможно, под влиянием изменения общей нейрональной активности.

Таблица 3

Влияние фенибута и препаратов сравнения на содержание норадреналина, дофамина, серотонина и их основных метаболитов в мозге мышей C57BL/6 на фоне действия ингибитора ДААК (нмоль/г ткани, $m \pm SEM$)

Table 3

Effect of phenibut and reference drugs on the level of norepinephrine, dopamine, serotonin and their main metabolites in the brain of C57BL/6 mice against the background of the action of the AADC inhibitor ($nmol/g$, $m \pm SEM$)

Моноамины и метаболиты / Monoamines and metabolites	Контроль (физраствор) / Control (saline)	Квинпиrol (0,1 мг/кг) / Quinpirole (0.1 mg/kg)	Сульпирид (25 мг/кг) / Sulpiride (25 mg/kg)	Фенибут (70 мг/кг) / Phenibut (70 mg/kg)	Атомоксетин (3 мг/кг) / Atomoxetine (3 mg/kg)
Префронтальная кора / Prefrontal cortex					
НА / NA	3,49+0,19	3,03+0,16	3,13+0,17	3,15+0,16	3,39+0,13
ДА / DA	1,58+0,17	1,26+0,09	1,36+0,13	1,02+0,07*	0,79+0,09*
ДОФУК / DOPAC	1,06+0,09	0,82+0,06*	0,60+0,07*	0,90+0,05	0,79+0,05*
3-МТ / 3-MT	0,18+0,01	0,11+0,02*	0,12+0,01*	0,11+0,01*	0,07+0,01*
ГВК / HVA	0,48+0,06	0,75+0,04*	1,27+0,07*	0,66+0,03*	0,75+0,05*
5-НТ / 5-HT	2,14+0,14	1,79+0,16	2,10+0,10	2,09+0,09	1,95+0,12
5-ГИУК / 5-HIAA	0,28+0,03	0,27+0,01	0,34+0,03	0,25+0,02	0,30+0,04
Стриатум / Striatum					
НА / NA	1,54+0,13	1,14+0,14	0,98+0,14*	0,95+0,12*	1,00+0,05*
ДА / DA	110,56+5,45	112,76+3,74	108,99+7,25	103,45+4,10	113,16+6,87
ДОФУК / DOPAC	2,70+0,20	2,19+0,16*	3,33+0,16#	3,02+0,23	2,86+0,17
3-МТ / 3-MT	3,77+0,33	3,20+0,37	3,98+0,21	3,86+0,22	4,16+0,21
ГВК / HVA	5,38+0,51	4,12+0,41	5,39+0,33	4,95+0,24	5,43+0,26
5-НТ / 5-HT	2,09+0,17	2,39+0,25	2,11+0,17	1,98+0,11	1,85+0,16
5-ГИУК / 5-HIAA	1,39+0,17	1,38+0,20	1,43+0,21	1,41+0,11	1,51+0,10
Примечания: * – статистически значимое отличие от контроля при $p < 0,05$ (U-критерий Манна–Уитни); # – тенденция к значимому отличию от контроля ($0,05 < p < 0,10$)					
Notes: * – statistically significant difference from the control at $p < 0.05$ (Mann–Whitney test); # – tendency to significant difference from the control ($0.05 < p < 0.10$).					

Заключение / Conclusion

Таким образом, в проведённой работе показано, что ни фенибут, ни атомоксетин не обладают способностью прямым способом воздействовать на биосинтез дофамина ни в ПФК, ни в стриатуме мышей C57BL/6. Отсутствие у препаратов модулирующего эффекта на фоне ингибирования ДААК в сравнении с действием стандартных лигандов ДА-рецепторов сульпирида и квинпирола, показавших влияние на накопление ДОФА (более специфично проявляющееся в стриатуме, где D₂-антагонист сульпирид значительно увеличивал, а D₂-агонист квинпирил, напротив, несколько уменьшал концентрацию ДОФА), указывает на неэффективность фенибута и атомоксетина по отношению к биосинтезу дофамина.

Такая специфичность сульпирида и квинпирола воспроизведена в их влиянии на метаболический оборот ДА в стриатуме, где D₂-антагонист и D₂-агонист разнонаправленно изменяли отношения ДОФУК/ДА и ГВК/ДА, а также концентрации ДОФУК, что предполагает их воздействие на метаболизм ДА через D₂-ауторецепторное звено. Недостаточно выраженную степень этого влияния можно объяснить фоновым влиянием ингибитора ДААК, безусловно вмешивающимся в метаболизм ДА. Дополнительным аргументом в пользу участия ауторецепторного звена в механизме действия сульпирида и квинпирола можно считать отсутствие ДА-ергического компонента в эффектах фенибута и атомоксетина.

В отношении накопления 5-ГТф как D₂-лиганды сульпирид и квинпирил, так и атомоксетин и фенибут действовали однонаправленно: снижали уровень 5-ГТф в ПФК и были неэффективны в отношении биосинтеза серотонина в стриатуме. Рассматривая это совместно с отсутствием изменений в метаболическом обороте серотонина и уровней 5-НТ и 5-ГИУК в обеих структурах мозга, можно допустить, что уменьшение

концентраций 5-ГТф в ПФК осуществляется под влиянием неспецифических механизмов, например, как следствие изменения общенейрональной активности.

Таким образом, полученные результаты не поддерживают предположение об участии в механизме действия фенибута и атомоксетина D₂-ауторецепторов, регулирующих функциональную активность ДА-ергических синапсов посредством контроля экспрессии тирозингидроксилазы и дофаминовых транспортеров. Имеющиеся сведения об увеличении экстраклеточных концентраций ДА и НА (но не 5-НТ) в ПФК свободно-подвижных крыс под влиянием атомоксетина (0,3–1,0 мг/кг, в/б) соответствуют скорее варианту с ауторецепторной регуляцией высвобождения ДА [14]. Изучение роли ГАМК_B-рецепторов в процессе коррекции фенибутом синаптической активности ДА-терминалей при сниженном уровне внимания [3] представляется актуальной задачей ближайших исследований.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0521-2019-0009 «Анализ рецепторных механизмов и поиск средств фармакологической протекции ЦНС при нарушениях мозгового кровообращения и когнитивных расстройствах».

Financing. The work was carried out within the framework of State task No. 0521-2019-0009 "Analysis of receptor mechanisms and search for pharmacological protection of the central nervous system in disorders of cerebral circulation and cognitive disorders".

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interest.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сухорукова Наталия Альбертовна

e-mail: compcard@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6412-4833>

SPIN-код: 2656-4174

м. н. с. лаборатории радиоизотопных методов исследований ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Sukhorukova Natalia A.

e-mail: compcard@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6412-4833>

SPIN code: 2656-4174

Junior researcher, Laboratory of Radioisotope Research Methods FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Кудрин Владимир Сергеевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0321-5125>
SPIN-код: 3986-3262

к. м. н., заведующий лабораторией
нейрохимической фармакологии ФГБНУ
«НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,
Москва, Россия

Наркевич Виктор Борисович

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

Ковалёв Георгий Иванович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: kovalev@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8597-7018>
SPIN-код: 8461-8814

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией
радиоизотопных методов исследований
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. За-
кусова», Москва, Россия

Kudrin Vladimir S.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0321-5125>
SPIN code: 3986-3262

PhD in Medicine, Head of the Laboratory of Neu-
rochemical Pharmacology, FSBI «Zakusov Insti-
tute of Pharmacology», Moscow, Russia

Narkevich Victor B.

PhD in Medicine, Senior Research Scientist, Labo-
ratory of Neurochemical Pharmacology, FSBI
«Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow,
Russia

Kovalev Georgy I.

Corresponding author

e-mail: kovalev@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8597-7018>
SPIN code: 8461-8814

Dr. Sci. (Med.), professor, Head of the laboratory
of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov
Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Lapin I. Phenibut (beta-phenyl-GABA): a tranquilizer and nootropic drug. *CNS Drug Rev.* 2001;7(4):471–481. DOI: 10.1111/j.1527-3458.2001.tb00211.x

2. Zavadenko NN, Yu SN. Attention deficit disorder: Study of motor control, memory and experience with nootropics. *Eur J Paediatr Neurol.* 1999;3(6):A86. DOI: 10.1016/S1090-3798(99)91216-3.

3. Ковалев Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В. и др. Анализ поведенческих и нейроцепторных эффектов атомоксетина и фенибута у мышей CD-1 с различной устойчивостью внимания. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2021;84(4):3–11. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Vasileva EV et al. Analysis of behavioral and neuroreceptor effects of atomoxetine and phenibut in CD-1 mice subpopulations diverging in sustained attention. *Ekspierimental'naia i Klinicheskaia Farmakologija.* 2021;84(4):3–11. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-4-3-11.

4. Бородкина Л.Е., Кудрин В.С., Клодт П.М. и др. Влияние фенибута на содержание моноаминов и их метаболитов, а также нейротрансмиттерных аминокислот в структурах мозга крысы. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2009;72(1):60–63. [Borodkina LE, Kudrin VS, Klodt PM. et al., Effect of phenibut on the content of monoamines, their metabolites, and neurotransmitter amino acids in rat brain structures. *Ekspierimental'naia i Klinicheskaia Farmakologija.* 2009;72(1):60–63. (In Russ).]. DOI:10.30906/0869-2092-2009-72-1-60-63.

5. Ковалев Г.И., Салимов Р.М., Сухорукова Н.А. и др. Нейрорецепторный профиль и поведение субпопуляций мышей CD-1, различающихся устойчивостью внимания. *Нейрохимия.* 2020;37(1):15–23. [Kovalev GI, Salimov RM, Sukhorukova NA et al. Neuroreceptor Profile and Behavior of CD-1 Mice Subpopulations with Different Attention Stability. *Neurochemical Journal.* 2020;37(1):15–23. (In Russ).]. DOI: 10.31857/S1027813320010148.

6. Romanelli RJ, Williams JT, Neve KA. Dopamine Receptor Signaling: Intracellular Pathways to Behavior. In: Neve KA, editor. *The Dopamine Receptors.* Portland OR: *Humana Press*; 2010. p. 137–174. DOI: 10.1007/978-1-60327-333-6-6.

7. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2011;63(1):182–217. DOI: 10.1124/pr.110.002642

8. Кудрин В.С., Надорова А.В., Наркевич В.Б., Колик Л.Г. Изучение поведенческих и нейрохимических эффектов гимантана на динамику гиперлокомоторной реакции, индуцированной этанолом, у мышей линии DBA/2. *Нейрохимия.* 2018;35(1): 62–69. [Kudrin VS, Nadorova AV, Narkevich VB, Kolik LG. An Analysis of the Behavioral and Neurochemical Effects of Himantane on the Dynamics of the Ethanol-Induced Hyperlocomotor Response in DBA/2 Mice. *Neurochemical Journal.* 2018;35(1): 62–69. (In Russ).]. DOI: 10.7868/S1027813318010065.

9. Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem.* 1966;13(8):655–669. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1966.tb09873.x.

10. Carlsson A, Kehr W, Lindqvist M. Agonist–antagonist interaction on dopamine receptors in brain, as reflected in the rates of tyrosine and tryptophan hydroxylation. *J Neural Transm.* 1977;40(2):99–113. DOI: 10.1007/BF01250562.

11. Абаимов Д.А., Зимин И.А., Кудрин В.С., Ковалев Г.И. Влияние противопаркинсонического препарата гимантана на содержание и метаболизм нейромедиаторных моноаминов в структурах головного мозга мышей C57BL/6. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2009;72(1): 64–67. [Abaimov DA, Zimin IA, Kudrin VS, Kovalev GI. Effects of antiparkinsonian drug hemantane on the level and metabolism of biogenic monoamines in brain structures of C57BL/6 mice. *Ekspierimental'naia i Klinicheskaia Farmakologija.* 2009;72(1): 64–67. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2009-72-1-64-67.

12. Ford CP. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience.* 2014;282:13–22. DOI:10.1016/j.neuroscience.2014.01.025.

13. Alexander SPH, Christopoulos A, Davenport AP et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol.* 2019;176 Suppl 1(Suppl 1):S21–141. DOI:10.1111/bph.14748.

14. Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL et al. Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2002; 27(5):699–711. DOI: 10.1016/S0893-133X(02)00346-9.

Гендерные различия в формировании эпилептической системы у самцов и у самок крыс в зависимости от стадий эстрального цикла на модели очаговой кобальтовой эпилепсии

Воронина Т. А., Литвинова С. А., Филатова Ю. Б.

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

Аннотация. В настоящей работе на модели очаговой кобальтовой эпилепсии изучены особенности формирования эпилептической системы у самцов и у самок крыс в зависимости от стадий эстрального цикла. Установлено, что у самцов крыс на стабильном этапе первой стадии развития эпилептической системы Эпи активность (число и длительность разрядов в минуту) наиболее выражена в контрлатеральной и ипсилатеральной коре, а у самок крыс ведущие структуры мозга, вовлекаемые в генерацию ЭпА, зависят от фаз эстрального цикла. В фазу диэструс2 у самок ведущей структурой, генерирующей ЭпА, как и у самцов, является контрлатеральная кора, а в фазы проэструс и эструс, которые характеризуются высоким содержанием половых гормонов, у самок наблюдается существенное преобладание ЭпА в латеральном гипоталамусе и дорзальном гиппокампе.

Ключевые слова: гендерные различия; самцы крыс; самки крыс; эстральный цикл; эпилептическая система; кобальтовая эпилепсия; ЭЭГ

Для цитирования:

Воронина Т. А., Литвинова С. А., Филатова Ю. Б. Гендерные различия в формировании эпилептической системы у самцов и у самок крыс в зависимости от стадий эстрального цикла на модели очаговой кобальтовой эпилепсии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(3):26–30. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-26-30>

Поступила: 26 ноября 2021 г. **Принята:** 03 декабря 2021 г. **Опубликована:** 15 декабря 2021 г.

Gender differences in the formation of the epileptic system in male and female rats depending on the stage of the estrous cycle on the model of focal cobalt epilepsy

Voronina TA, Litvinova SA, Filatova YuB

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. In this work, the features of the formation of the epileptic system in male and female rats, depending on the stages of the estrous cycle, were studied on the model of focal cobalt epilepsy. It was found that in male rats at the stable stage of the first stage of development of the epileptic system, Epi activity (the number and duration of discharges per minute) is most pronounced in the contralateral and ipsilateral cortex, and in female rats, the leading brain structures involved in the generation of EpA depend on the phases of the estrous cycle. In the diestrus2 phase, in females, the leading structure generating EpA, as in males, is the contralateral cortex, and in the proestrus and estrus phases, which are characterized by a high content of sex hormones, in females there is a significant predominance of EpA in the lateral hypothalamus and dorsal hippocampus.

Keywords: gender differences; male rats; female rats; estrous cycle; epileptic system; cobalt epilepsy; EEG

For citations:

Voronina TA, Litvinova SA, Filatova YuB. Gender differences in the formation of the epileptic system in male and female rats depending on the stage of the estrous cycle on the model of focal cobalt epilepsy. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(3):26–30. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-26-30>

Received: November 26, 2021. **Accepted:** December 03, 2021. **Published:** December 15, 2021.

Введение / Introduction

Эпилепсия представляет собой гетерогенную группу заболеваний (около 40 форм), которые имеют различные клинические проявления. Эпилепсией страдают мужчины и женщины, дети, взрослые и пожилые люди, а поскольку эпилепсия является неврологическим расстройством, которое затрагивает гормональную сферу и может осложнять репродуктивное здоровье женщины [1–5], большое значение имеет исследование гендерных различий в патологии эпилепсии и особенностей действия противоэпилептических препаратов у мужчин и женщин. В экспериментальных исследованиях на самках животных показано, что в разные фазы менструального цикла наблюдается изменение нейрональной возбудимости и судорожной готовности, выброса нейромедиаторов, что связано, прежде всего, с колебаниями в секреции гонадотропинов в течение цикла [6–9]. Показано, что эстрогены являются про-

конвульсантами и усиливают судорожные состояния, а прогестерон оказывает противосудорожное действие [10–12]. У женщин с эпилепсией эпилептические припадки, связанные с менструальным циклом, составляют до 70 % приступов [13, 14].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей формирования эпилептической системы у самцов и у самок крыс в зависимости от стадий эстрального цикла на модели очаговой кобальтовой эпилепсии.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные / Animals. Исследование выполнено на аутбредных, половозрелых самках и самцах белых аутбредных крыс массой 250–290 г (Питомник Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству,

оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 29 августа 2014 г. № 51. Организацию и проведение работы осуществляли в соответствии с Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Проведение опытов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Стадии эстрального цикла у самок крыс определялись при исследовании вагинального мазка с выделением стадий: Диэструс1, Диэструс2, Проэструс и Эструс.

Моделирование кобальтовой эпилепсии проводили согласно методике, описанной ранее [15]. Крысам вживляли долгосрочные электроды в левую (ипсилатеральную) (ИК) и правую (контралатеральную) (КК) сенсомоторную кору, латеральный гипоталамус (ЛГТ) и дорзальный гиппокамп (ДГК). Операции по вживлению долгосрочных электродов в структуры мозга крыс 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. Кортиковые 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). 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 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 ЭЭГ осуществлялась на 16-канальном нейрографе «Нейросенсор», работающем на базе IBM-PC. Параметры Эпи активности в структурах мозга были изучены на втором стабильном этапе первой стадии формирования эпилептической системы (на 3–4 сутки после наложения кобальта). Регистрировали число Эпи разрядов за минуту и их длительность в минуту в ипсилатеральной коре, контралатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе у самцов и самок крыс в различные фазы эстрального цикла.

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента, а также компьютерных программ «Brainwin» и «Brainsys». Полученные результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение / The results of the study and their discussion

Эпилептическая активность (ЭПА) у самцов крыс / Epileptic activity (EPA) in male rats

Показано, что у самцов крыс с кобальтовой эпилепсией на втором стабильном этапе первой стадии развития эпилептической системы ЭПА наиболее выражена в электрокортикограммах — контралатеральной и ипсилатеральной коре, тогда как в подкорковых структурах — латеральном гипоталамусе и дорзальном гиппокампе эпилептиформная активность представлена в меньшей степени (рис. 1). Ведущие структуры генерации ЭПА у самцов по показателям числа и длительности разрядов в минуту располагаются следующим образом: контралатеральная кора = ипсилатеральная кора > гиппокамп = гипоталамус. Полученные данные свидетельствуют о том, что у самцов на втором стабильном этапе первой стадии развития эпилептической системы показатели ЭПА были выше в корковых структурах, чем в подкорковых структурах.

Эпилептическая активность (ЭПА) у самок крыс в различные фазы эстрального цикла / Epileptic activity (EPA) in female rats in various phases of the estrous cycle

Установлено, что в фазу диэструс2, в которой наблюдается минимальное содержание половых гормонов и которая соответствует фазе менSTRUации у женщин, наблюдается существенное преобладание ЭПА в корковых структурах, а именно в контралатеральной коре и, в меньшей степени, в подкорковых структурах — дорзальном гиппокампе и латеральном гипоталамусе (рис. 2).

В противоположность этому, в фазы проэструс и эструс, которые характеризуются высоким содержанием половых гормонов, выявлено существенное преобладание ЭПА в подкорковых структурах — латеральном гипоталамусе (ЛГТ) и дорзальном гиппокампе (ДГК) по сравнению с корковыми структурами — ипси- и контралатеральной корой (рис. 2).

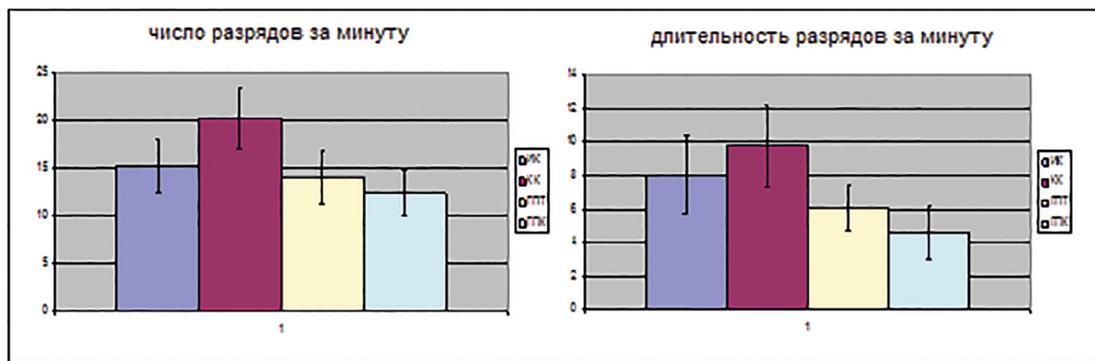


Рис. 1. Число и длительности разрядов за минуту в структурах мозга самцов крыс с кобальтовой эпилепсией на втором стабильном этапе первой стадии развития эпилептической системы
Fig. 1. The number and duration of discharges per minute in the brain structures of male rats with cobalt epilepsy at the second stable stage of the first stage of development of the epileptic system
Примечания: ИК – ипсилатеральная кора; КК – контралатеральная кора; ГПТ – латеральный гипоталамус; ГПК – дорзальный гиппокамп.
Notes: ИК – ipsilateral cortex; КК – contralateral cortex; ГПТ – lateral hypothalamus; ГПК – dorsal hippocampus.

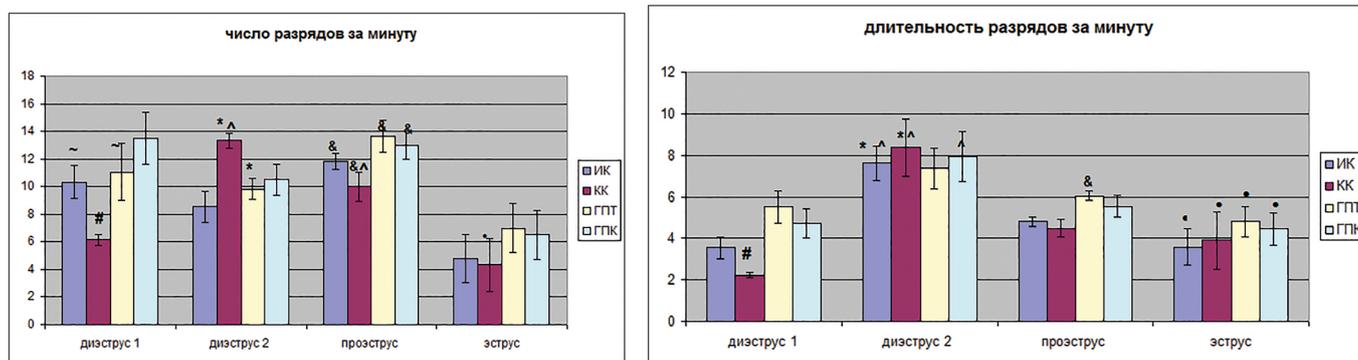


Рис. 2. Эпилептическая активность (число разрядов в минуту и длительность разрядов в минуту) в различные фазы эстрального цикла в структурах мозга самок крыс с кобальт-индуцированной эпилепсией
Fig. 2. Epileptic activity (number of discharges per minute and duration of discharges per minute) in various phases of the estrous cycle in the brain structures of female rats with cobalt-induced epilepsy
Примечания: ИК – ипсилатеральная кора; КК – контралатеральная кора; ГПТ – латеральный гипоталамус; ГПК – дорзальный гиппокамп. Достоверность при $p < 0,05$: ^ – по соотношению Диэструс2–Диэструс1; # – по соотношению Диэструс1–Проэструс; ~ – по соотношению Диэструс1–Эструс; * – по соотношению Диэструс2–Проэструс; • – по соотношению Эструс–Диэструс2; & – по соотношению Проэструс–Эструс.
Notes: ИК – ipsilateral cortex; КК – contralateral cortex; ГПТ – lateral hypothalamus; ГПК – dorsal hippocampus. Reliability at $p < 0.05$: ^ – by the ratio Diestrus2–Diestrus1; # – by the ratio Diestrus1–Proestrus; ~ – by the ratio Diestrus1–Estrus; * – by the ratio Diestrus2–Proestrus; • – by the ratio Estrus–Diestrus2; & – by the ratio Proestrus–Estrus.

В фазу диэструс1 ведущие структуры генерации ЭпА располагаются следующим образом: гиппокамп > гипоталамус ≥ ипсилатеральная кора > контралатеральная кора (рис. 2).

Таким образом на втором стабильном этапе первой стадии развития эпилептической системы у самцов Эпи активность наиболее выражена в электрокортикограммах – контралатеральной и ипсилатеральной коре, тогда как в подкорковых структурах – латеральном гипоталамусе и дорзальном гиппокампе – эпилептиформная активность представлена в меньшей степени.

У самок крыс формируются детерминантные эпилептические очаги не только в ипсилатеральной коре,

но и в контралатеральной коре и подкорковых структурах – латеральном гипоталамусе и дорзальном гиппокампе. Однако у самок крыс паттерны ЭпА (число и длительность разрядов в минуту) и ведущие структуры, вовлекаемые в генерацию ЭпА, зависят от фаз эстрального цикла. В фазу диэструс2, в которой наблюдается минимальное содержание половых гормонов, ведущей структурой, генерирующей ЭпА, как и у самцов, является контралатеральная кора, а в фазы проэструс и эструс, которые характеризуются высоким содержанием половых гормонов, наблюдается существенное преобладание ЭпА в подкорковых структурах – латеральном гипоталамусе и дорзальном гиппокампе.

Ранее было показано [16], что у самок крыс с кобальтовой эпилепсией достоверные колебания уровней ГАМК, глицина и таурина в зависимости от фаз эстрального цикла наблюдаются в контралатеральной коре; а наиболее выраженное снижение уровней аминокислот по сравнению с показателями ложнопериоперированных животных наблюдается в фазу диэструс2. Выявленные особенности формирования эпилептической системы у самцов и у самок крыс в зависимости от стадий эстрального цикла могут быть использованы для индивидуального подбора противоэпилептических препаратов для лечения некоторых форм очаговой эпилепсии у женщин.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

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

Financing. This work was carried out as part of the state assignment (project No. 0521-2019-0007) "Development of treatments for epilepsy, Parkinson's disease and autism based on new data on the pathogenesis of diseases".

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Воронина Татьяна Александровна
 Автор, ответственный за переписку
 e-mail: voroninata38@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/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: <https://orcid.org/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: <https://orcid.org/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: <https://orcid.org/0000-0001-9139-2334>
 PhD in Biology, Leading researcher Laboratory of Psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

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

Filatova Julia B.
 Laboratory Research Assistant Laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Карлов В.А. Эпилепсия у детей и взрослых женщин и мужчин: руководство для врачей. Москва: Медицина; – 2019. – 893 С. [Karlova 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. [Avakian GN, Voronina TA, Khromykh EA. Epilepsy. Pathogenesis. Pathogenetic therapy. Posobie dlya vrachey. 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. p. 83–117.
5. Wolf P. Nosology of the epilepsies and its reflection in classification. Comprehensive Epileptology. Proceeding of the conference Saint Petersburg. 2011. p. 181–189

6. Ридер Ф.К., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Бурд С.Г., Соломатин Ю.В., Калинина Т.С., Волкова А.В. Различная эффективность ламиктала у самок крыс на протяжении эстрального цикла. XII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». – Москва; 2005. – 55 с. [Reader FK, Voronina TA, Nerobkova LN, Burd SG, Solomatina YuV, Kalinina TS, Volkova AV. Different efficacy of lamictal in female rats during the estrous cycle. Russian National Congress "Man and Medicine". Russia, Moscow. 2005. p. 55. (In Russ).]
7. Сапронов Н.С., Федотова Ю.О., Гончаров Н.П. Половые гормоны и поведенческие реакции. *Вестник ПАМН*. 2001;12:29–34. [Sapronov NS, Fedotova YuO, Goncharov NP. Sex hormones and behavioral reactions. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2001;12:29–34. (In Russ).]
8. Herzog AG, Coleman AE, Jacobs AR, Klein P, Friedman MN, Drislane FW, Ransil BJ, Schomer DL. Interictal EEG discharges, reproductive hormones, and menstrual disorders in epilepsy. *Ann Neurol*. 2003 Nov;54(5):625–637. DOI: 10.1002/ana.10732.

9. Motta E. Epilepsy and hormones. *Neurol Neurochir Pol.* 2000;34 Suppl 1:31–33.
10. Foldvary-Schaefer N, Harden C, Herzog A, Falcone T. Hormones and seizures. *Cleve Clin J Med.* 2004 Feb;71 Suppl 2:S11-8. DOI: 10.3949/ccjm.71.suppl_2.s11.
11. Reddy DS, Castaneda DC, O'Malley BW, et al. Anticonvulsant activity of progesterone and neurosteroids in progesterone receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310:230–239. DOI: 10.1124/jpet.104.065268.
12. Reddy DS, Rogawski MA. Neurosteroid replacement therapy for catamenial epilepsy. *Neurotherapeutics.* 2009 Apr;6(2):392–401. DOI: 10.1016/j.nurt.2009.01.006.
13. Morrell MJ. Epilepsy in women. *Am Fam Physician.* 2002;66(8):1489–1494.
14. Herzog AG. Disorders of reproduction in patients with epilepsy: Primary neurological mechanisms. *Seizure* 2008;17(2):101–110. DOI: 10.1016/j.seizure.2007.11.025.
15. Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Методические рекомендации по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Москва: 2012. с. 235–250. [Voronina TA, Nerobkova LN. Methodological recommendations for the preclinical study of anticonvulsant activity of drugs. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines, Moscow: 2012. pp. 235–250. (In Russ).].
16. Филатова Ю.Б., Авакян Г.Н., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Клодт П.М., Кудрин В.С., Гайдуков И.А. Изменение содержания тормозных и возбуждающих аминокислот и эпилептической активности в структурах мозга самок крыс с кобальтовой эпилепсией в зависимости от фазы эстрального цикла. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния.* 2012;4(1):29–33. [Filatova YuB, Avakian GN, Voronina TA, Nerobkova LN, Klodt PM, Kudrin VS, Gaidukov IA. Changes in the levels of inhibitory and excitatory amino acids and neurophysiology characteristics in the brain structures of female rats with cobalt epileptogenic focus during different phases of the estrous cycle. *Epilepsy and paroxysmal states.* 2012;4(1):29–33. (In Russ).].

Динамика кардиоэлектрического поля крыс при хроническом воздействии доксорубицина в период деполяризации предсердий

Смирнова С. Л.¹, Суслонова О. В.¹, Рощевская И. М.²

¹ – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр "Кому научный центр Уральского отделения Российской академии наук", Сыктывкар, Россия

² – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аннотация. Целью работы является неинвазивное выявление особенностей начальной предсердной активности по динамике кардиоэлектрического поля на поверхности грудной клетки экспериментальных животных при хроническом воздействии доксорубицина. *Материалы и методы.* Исследованы распределение и динамика изменения кардиоэлектрических потенциалов на поверхности грудной клетки крыс при хроническом воздействии доксорубицина в период начальной предсердной активности. Доксорубицин вводили внутривентриально по 1,5 мг/кг один раз в неделю на протяжении месяца. Кумулятивная доза составила 6 мг/кг массы тела животного. *Результаты.* Показано, что хроническое воздействие доксорубицина приводит к изменениям динамики взаимного расположения положительных и отрицательных кардиопотенциалов электрического поля сердца на поверхности грудной клетки крыс в периоды восходящей и нисходящей P-волны на ЭКГ в отведениях от конечностей. Выявлено достоверно более раннее начало образования кардиоэлектрического поля, характерного для деполяризации предсердий, на поверхности тела, начала, вершины и окончания P-волны на ЭКГ во II отведении от конечностей после длительного введения доксорубицина по сравнению с исходным состоянием. *Заключение.* Хроническое воздействие доксорубицина вызывает значимые изменения начальной предсердной активности, что приводит в соответствующий период деполяризации предсердий к существенному изменению динамики кардиоэлектрического поля на поверхности грудной клетки животных.

Ключевые слова: электрическое поле сердца; предсердия; доксорубицин; крысы

Для цитирования:

Смирнова С. Л., Суслонова О. В., Рощевская И. М. Динамика кардиоэлектрического поля крыс при хроническом воздействии доксорубицина в период деполяризации предсердий. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2021;(3):31–35. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-31-35>

Поступила: 26 ноября 2021 г. **Принята:** 02 декабря 2021 г. **Опубликована:** 15 декабря 2021 г.

Dynamics of the cardioelectric field of rats under chronic exposure to doxorubicin during atrial depolarization

Smirnova SL¹, Suslonova OV¹, Roshchevskaya IM²

¹ – Federal Research Center "Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences", Syktyvkar, Russia

² – FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. *The aim* of the work is non-invasive identification of the features of the initial atrial activity by the dynamics of the cardioelectric field on the surface of the chest of experimental animals under chronic exposure to doxorubicin. *Materials and methods.* The distribution and dynamics of changes in cardioelectric potentials on the surface of the chest of rats under chronic exposure to doxorubicin during the period of initial atrial activity were investigated. Doxorubicin was administered intraperitoneally 1.5 mg/kg once a week for a month. The cumulative dose was 6 mg/kg animal weight. *Results.* It has been shown that chronic exposure to doxorubicin leads to changes in the positional dynamics of positive and negative cardiopotentials cardioelectric field of heart on the chest surface during the ascending and descending P-wave on the ECG in the II limb leads. It is observed significantly earlier the beginning of cardioelectric field formation, characteristic of atrial depolarization, on the body surface, the beginning, the peak and the end of the P-wave on the ECG in the II limb leads compared to the initial state. *Conclusion.* Chronic exposure to doxorubicin causes significant changes in the initial atrial activity, which leads to a significant change in the corresponding period of atrial depolarization in the dynamics of the cardioelectric field on the surface of the thorax of animals.

Keywords: electrical field of the heart; atria; doxorubicin; rats

For citations:

Smirnova SL, Suslonova OV, Roshchevskaya IM. Dynamics of the cardioelectric field of rats under chronic exposure to doxorubicin during atrial depolarization. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2021;(3):31–35. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-31-35>

Received: November 26, 2021. **Accepted:** December 02, 2021. **Published:** December 15, 2021.

Введение / Introduction

Антрациклины являются ключевым компонентом многих режимов химиотерапии при лечении гематологических злокачественных новообразований и солидных опухолей, хотя их применение ограничено из-за их сильной кардиотоксичности, которая проявляется в нарушении диастолической функции левого желудочка, развитии кардиомиопатии, что в конечном итоге приводит к тяжёлой сердечной недостаточности и смерти [1]. Введение доксорубицина может приводить к различным аритмиям как в острых, так и в

хронических состояниях. Наиболее часто выявляются суправентрикулярные и желудочковые экстрасистолы. У 6 % пациентов развивается фибрилляция предсердий, что является предиктором неблагоприятных исходов химиотерапии доксорубицином [2]. Электрокардиографические изменения при развитии доксорубициновой токсичности заключаются в удлинении QT-интервала, изменению ST сегмента и амплитуды T-волны [3, 4], расширении QRS комплекса [4, 5].

На сегодняшний день не до конца известна патология развития электрической нестабильности сердца, вызываемой доксорубицином. Первостепенное

значение для улучшения клинических исходов у онкологических больных имеет понимание механизмов развития доксорубицин-индуцированных электрических изменений сердца [2].

Механизмы изменений процесса деполяризации предсердий и формирования предсердных аритмий при кумулятивном действии доксорубицина не выяснены.

Цель – неинвазивное выявление особенностей деполяризации предсердий у крыс при хроническом воздействии доксорубицина по динамике изменений электрического поля сердца на поверхности грудной клетки.

Материал и методы / Material and methods

Животные. Эксперименты выполнены на самцах крыс линии Вистар ($n=10$), возрастом 3–4 месяца, массой 400–450 г, полученных из питомника лабораторных животных "Пушино" (г. Пушино, Россия).

Доксорубицин вводили внутривенно по 1,5 мг/кг раз в неделю на протяжении месяца. Кумулятивная доза составила 6 мг/кг массы тела животного.

До (исходное состояние) и спустя два месяца (через 8 недель) после первой инъекции препарата проводили поверхностное картирование кардиоэлектрических потенциалов.

Электрофизиология. Электрическое поле сердца на поверхности тела крыс при хроническом воздействии доксорубицина в период деполяризации предсердий исследовано методом множественной синхронной кардиоэлектротопографии. Животных наркотизировали зоветилом (3,5 мг/100 г массы животного в/м).

Синхронную регистрацию кардиопотенциалов осуществляли от 64 подкожных игольчатых электродов, равномерно распределённых по поверхности грудной клетки (по четыре ряда на вентральной и дорсальной сторонам тела) при помощи электрокардиотопографической системы. Синхронно с униполярными кардиоэлектрическими потенциалами на поверхности тела регистрировали ЭКГ в биполярных отведениях от конечностей.

Кардиоэлектрическое поле на поверхности тела анализировали по моментным эквипотенциальным картам. В качестве реперного использовали ЭКГ во втором отведении от конечностей, отсчёт времени производили относительно пика зубца R_{II} в мс (момент времени до R_{II} -пика указывается со знаком минус).

Статистика. Статистическая обработка проведена с помощью пакета программ статистического анализа Statistica 10.0. Значимость различий средних значений в группах оценивали с помощью Т-критерия Уилкоксона при $p \leq 0,05$. Данные представляли в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение.

Результаты / Results

Исходное состояние ($n = 10$). До возникновения на ЭКГ во II отведении от конечностей Р-волны (за $-59,4 \pm 7,1$ мс до R_{II} пика) на поверхности тела крыс формируется кардиоэлектрическое поле с краниальной областью положительных кардиоэлектрических потенциалов, каудальной – отрицательных (табл. 1).

Таблица 1

Временные характеристики кардиоэлектрического поля на поверхности тела и R_{II} -волны на ЭКГ во II отведении от конечностей у крыс до и после хронического воздействия доксорубицина

Table 1

Temporal characteristics of the cardioelectric field on the body surface and R_{II} -wave on ECG in II limb leads in rats before and after chronic exposure to doxorubicin

Параметр / Parameter	Исходное состояние / The initial state	После введения доксорубицина / After doxorubicin administration
Начало формирования кардиоэлектрического поля, характерного для деполяризации предсердий, мс / The beginning of the formation of the cardioelectric field characteristic of atrial depolarization, ms	$-59,4 \pm 7,1$	$-64,7 \pm 5,5^*$
Начало R_{II} -волны, мс / R_{II} -wave beginning, ms	$-53,8 \pm 7,4$	$-58,2 \pm 5,9^*$
Вершина R_{II} -волны, мс / R_{II} -wave peak, ms	$-47,7 \pm 5,9$	$-51,6 \pm 5,3^*$
Конец R_{II} -волны, мс / End of R_{II} -wave, ms	$-40,7 \pm 5,3$	$-46 \pm 5,4^*$
Длительность инверсии, мс / Inversion duration, ms	$5,7 \pm 2,7$	$6,4 \pm 1,5$
Длительность восходящей фазы R_{II} -волны, мс / The duration of the ascending phase of the R_{II} -wave, ms	$6,1 \pm 2,7$	$6,6 \pm 2,3$
Длительность нисходящей фазы R_{II} -волны, мс / The duration of the downward phase of the R_{II} -wave, ms	$6,9 \pm 1,5$	$5,6 \pm 2,1$
Длительность R_{II} -волны, мс / R_{II} -wave duration, ms	$13,1 \pm 3,2$	$12,3 \pm 3,9$

Примечания: данные представляли в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение. * – различия значимы по Т-критерию Уилкоксона при $p \leq 0,05$ ($n = 10$).

Notes: Data were presented as arithmetic mean \pm standard deviation. * – differences are significant according to the Wilcoxon T-test at $p \leq 0.05$ ($n = 10$).

До начала восходящей фазы Р-волны происходит смещение зон положительных и отрицательных кардиопотенциалов на поверхности грудной клетки (рис. 1). Область положительных потенциалов смещается каудально, отрицательных — краниально на вентральную и дорсальную стороны. Изменение взаимного расположения положительных и отрицательных зон кардиоэлектрических потенциалов завершается на $-53,8 \pm 7,4$ мс, к моменту начала Р-волны ЭКГ во II отведении от конечностей. В период восходящей и нисходящих фаз Р-волны расположение зон кардиоэлектрических потенциалов остаётся неизменным: область положительных потенциалов расположена каудально, отрицательных — краниально на вентральной и дорсальной поверхности. Такое взаимное расположение областей положительных и отрицательных потенциалов сохраняется до конца Р-волны на ЭКГ во II отведении от конечностей на $-40,7 \pm 5,3$ мс до R_{II} пика.

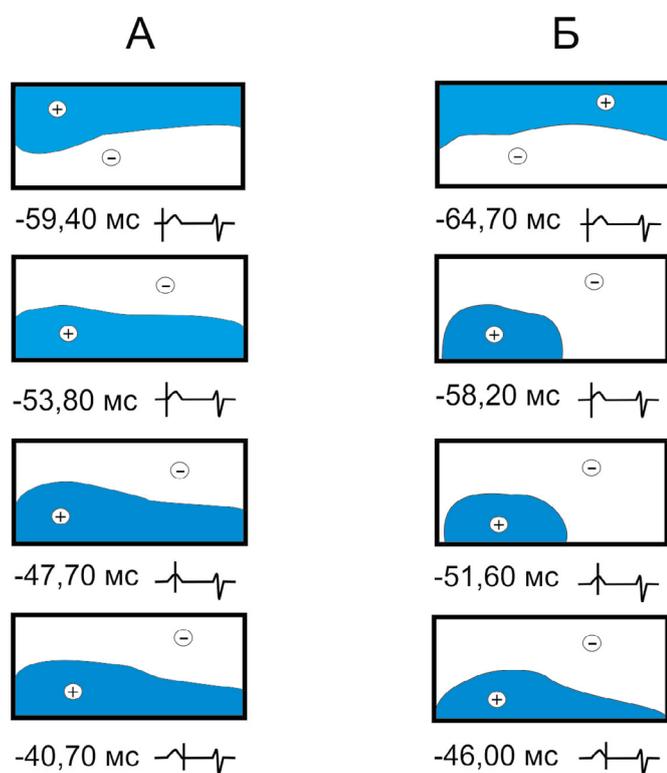


Рис. 1. Эквипотенциальные моментные карты на поверхности тела в период деполяризации предсердий у крыс при хроническом воздействии доксорубицина. Исходное состояние (А), после введения доксорубицина (Б)

Fig. 1. Equipotential moment maps on the body surface during atrial depolarization in rats under chronic exposure to doxorubicin. Initial state (A), after administration of doxorubicin (B)

Примечания: на каждой карте закрашена область положительных кардиопотенциалов. Под каждой картой указано время в мс относительно пика R; приведена ЭКГ во втором отведении с маркером времени.
Notes: On each card, the area of positive cardiopotentials is filled. Under each map is the time in ms relative to the R peak; shows an ECG in the second limb lead with a time marker.

После введения доксорубицина. До возникновения на ЭКГ во II отведении от конечностей Р-волны ($-64,7 \pm 5,5$ мс до R пика) на поверхности тела крыс формируется кардиоэлектрическое поле с краниальной областью положительных кардиоэлектрических потенциалов, каудальной — отрицательных (см. табл. 1).

До начала восходящей фазы Р-волны происходит смещение зон положительных и отрицательных кардиопотенциалов на электрическом поле сердца на поверхности грудной клетки. Область положительных потенциалов смещается каудально в центральную часть вентральной стороны тела и занимает примерно 1/3 её поверхности. Область отрицательных кардиопотенциалов после инверсии занимает полностью дорсальную сторону и краниальную часть вентральной поверхности туловища. Изменение взаимного расположения положительных и отрицательных зон кардиоэлектрических потенциалов завершается на $-58,2 \pm 5,9$ мс, т. е. к моменту начала Р-волны на ЭКГ во II отведении от конечностей. В период восходящей фазы Р-волны расположение зон кардиоэлектрических потенциалов не меняется: область положительных потенциалов занимает 1/3 каудальной части на вентральной поверхности грудной клетки; отрицательных — расположена краниально на вентральной и на всей дорсальной поверхности. В период нисходящей фазы Р-волны зона положительных кардиопотенциалов увеличивается в размере и занимает каудальную часть вентральной и дорсальных сторон грудной клетки, краниальную часть охватывает зона отрицательных потенциалов. Такое расположение областей положительных и отрицательных потенциалов сохраняется до конца Р-волны на ЭКГ во II отведении от конечностей на $-46,8 \pm 5,4$ мс.

Обсуждение / Discussion

Доксорубин обладает проаритмическими свойствами, что способствует развитию различных типов аритмии. Препарат влияет на электрофизиологические свойства сердца [2]. Показано значительное снижение диастолической функции и нарушение проведения возбуждения левого предсердия у пациентов после химиотерапии доксорубицином [6].

У животных в период Р_{II}-волны на кардиоэлектрическом поле на поверхности тела наблюдается однотипное расположение областей положительных и отрицательных кардиопотенциалов у разных видов теплокровных животных и человека. Равномерное распространение волны возбуждения по предсердиям от синоатриального узла отражается однотипным расположением областей положительных и отрицательных кардиопотенциалов на поверхности тела в период восходящей и нисходящей фаз Р-волны [7].

Проведённые нами ранее исследования кардиоэлектрического поля крыс с различными экспериментальными моделями показали, что изменение последовательности деполяризации предсердий приводит к

существенным изменениям динамики расположения зон положительных и отрицательных кардиоэлектрических потенциалов на поверхности тела в определённые периоды времени.

У спонтанно-гипертензивных крыс линии SHR в период восходящей и нисходящей фаз Р-волны на ЭКГ показано нетипичное для нормотензивных животных расположение областей положительных и отрицательных кардиопотенциалов кардиоэлектрического поля на поверхности тела. Область положительных потенциалов расположена каудально на вентральной стороне тела и занимает примерно 2/3 поверхности, область отрицательных кардиопотенциалов занимает полностью дорсальную сторону и краниальную часть вентральной поверхности [8].

Лёгочная гипертензия приводит к появлению дополнительного, кроме синоатриального узла, очага начального возбуждения в области устьев лёгочных вен, что влечёт за собой увеличение неоднородности распространения волны возбуждения по субэпикарду предсердий. Появление дополнительного очага возбуждения в устьях лёгочных вен в левом предсердии меняет последовательность деполяризации субэпикарда предсердий, что отражается изменением расположения зон положительных и отрицательных кардиоэлектрических потенциалов на поверхности тела до начала и в период Р-волны по сравнению с исходным состоянием [7].

У крыс с алкогольной кардиомиопатией выявлена значительная неоднородность последовательности деполяризации правого и левого предсердий и межпредсердной перегородки, вызванная формированием двух источников начальной активации в правом и левом предсердиях [9]. Формирование двух источников ранней активации в предсердиях вызывает значимые

изменения пространственных и временных параметров кардиоэлектрического поля на начальных этапах деполяризации предсердий, до начала Р_{II}-волны на ЭКГ во II отведении от конечностей [10].

Согласно нашим исследованиям, хроническое воздействие доксорубина приводит к изменениям динамики положительных и отрицательных кардиопотенциалов на поверхности тела в период восходящей и нисходящей фаз Р_{II}-волны на ЭКГ. Наблюдается достоверно более раннее начало формирования кардиоэлектрического поля на поверхности тела, начало Р_{II}-волны, вершина Р_{II}-волны, конец Р_{II}-волны на ЭКГ во II отведении от конечностей по сравнению с исходным состоянием.

Заключение / Conclusion

Хроническое воздействие доксорубина вызывает значимые изменения пространственных и временных параметров электрического поля сердца на поверхности грудной клетки животных в период Р-волны на ЭКГ во II отведении от конечностей, свидетельствующее об изменении последовательности деполяризации предсердий.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interests. The authors of the article confirmed the absence of a conflict of interest, financial support, which must be reported.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Смирнова Светлана Леонидовна

e-mail: smirnova.sl@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4292-2444>

к. б. н., зав. отделом ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

Суслонова Ольга Владимировна

e-mail: evgeniu2006@inbox.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7641-9145>

н. с. ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

Smirnova Svetlana L.

e-mail: smirnova.sl@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4292-2444>

PhD in Biology, Head of the department FRC Komi SC UB RAS, Syktyvkar, Russia

Susloнова Olga V.

e-mail: evgeniu2006@inbox.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7641-9145>

Research associate FRC Komi SC UB RAS, Syktyvkar, Russia

Роцевская Ирина Михайловна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: compcard@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6108-1444>

д. б. н., член-корреспондент РАН,
главный научный сотрудник лаборатории
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва,
Россия

Roshchevskaya Irina M.

Corresponding author

e-mail: compcard@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6108-1444>

Dr. Sci. (Biol.), Corresponding Member RAS,
Chief Researcher of the Laboratory of Pharma-
cological Screening FSBI «Zakusov Institute of
Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Luu AZ, Chowdhury BB, Al-Omran M et al. Role of endothelium in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci.* 2018;3(6):861–870. DOI: 10.1016/j.jacbts.2018.06.005.
2. Чаулин А.М., Дупляков Д.В. Аритмогенные эффекты доксорубина. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2020;9(3):69–78. [Chaulin AM, Duplyakov DV. Arrhythmogenic effects of doxorubicin. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2020;9(3):69–78 (In Russ).]. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-3-69-80.
3. Aygun H, Gul SS. Cardioprotective effect of melatonin and agomelatine on doxorubicin-induced cardiotoxicity in a rat model: an electrocardiographic, scintigraphic and biochemical study. *Bratisl Lek Listy.* 2019;120(4):249–255. DOI: 10.4149/BLL_2019_045.
4. Sonawane VK, Mahajan UB, Shinde SD et al. A chemosensitizer drug: disulfiram prevents doxorubicin-induced cardiac dysfunction and oxidative stress in rats. *Cardiovasc Toxicol.* 2018;18(5):459–470. DOI: 10.1007/s12012-018-9458-y.
5. Jafarinezhad Z, Rafati A, Ketabchi F et al. Cardioprotective effects of curcumin and carvacrol in doxorubicin-treated rats: Stereological study. *Food Sci Nutr.* 2019;7(11):3581–3588. DOI: 10.1002/fsn3.1210.
6. Yaylali YT, Saricopur A, Yurtdas M et al. Atrial function in patients with breast cancer after treatment with anthracyclines. *Arq Bras Cardiol.* 2016;107(5):411–419. DOI: 10.5935/abc.20160146.
7. Смирнова С.Л., Сулонова О.В., Роцевская И.М. Неинвазивное выявление аритмогенных очагов предсердий по кардиоэлектрическому полю на поверхности тела при экспериментальной легочной ги-

пертензии. *Вестник аритмологии.* 2020;1(99): 63–69. [Smirnova SL, Suslonova OV, Roshchevskaya IM. Non-invasive detection of arrhythmogenic foci of atria by using the cardioelectric field on the surface of the body during experimental pulmonary hypertension. *Journal of Arrhythmology.* 2020;1(99): 63–69. (In Russ).]. DOI: 10.35336/VA-2020-1-63-69.

8. Смирнова С.Л., Сулонова О.В., Роцевская И.М. Электрическое поле сердца на поверхности тела в период деполяризации предсердий у крыс со спонтанной артериальной гипертензией. *Практическая медицина.* 2018;1(112):61–64. [Smirnova SL, Suslonova OV, Roshchevskaya IM. Cardioelectric field on the body surface during atrial depolarization in rats with spontaneous arterial hypertension. *Practical Medicine.* 2018;1(112): 61–64. (In Russ).].

9. Смирнова С.Л., Роцевская И.М., Роцевский М.П., и др. Деполяризация предсердий у крыс с алкогольной кардиомиопатией. *Доклады академии наук.* 2018;479(1):96–98. [Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Roshchevsky MP et al. Atria depolarization in rats with alcoholic cardiomyopathy. *Doklady biological sciences.* 2018;479(1):41–43. (In Russ).]. DOI: 10.7868/S0869565218010231.

10. Смирнова С.Л., Роцевская И.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Колик Л.Г., Крыжановский С.А. Кардиоэлектрическое поле на поверхности тела в период деполяризации предсердий у крыс с алкогольной кардиомиопатией. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2019;(2):17–22. [Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kolik LG, Kryzhanovskii SA. Cardioelectric field on the body surface during atrial depolarization in rats with alcoholic cardiomyopathy. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2019;(2):17–22. (In Russ).]. DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10041.

Популяционный фармакокинетический анализ в программе Lixoft Monolix

Платова А. И.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр психического здоровья»,
Москва, Россия

Аннотация. В статье рассматривается пошаговый алгоритм построения популяционных фармакокинетических моделей в программе Lixoft Monolix. Описаны особенности методологии популяционных фармакокинетических исследований. Отдельное внимание уделяется преимуществам камерного подхода и нелинейного моделирования смешанных эффектов в изучении фармакокинетики. Описаны методы оценивания популяционных фармакокинетических параметров и их реализация в программном обеспечении.

Ключевые слова: Monolix; NLMEM; SAEM; MCMC; байесовский функционал; ММП; ФК; ПФК

Для цитирования:

Платова А. И. Популяционный фармакокинетический анализ в программе Monolix. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2021;(3): 36–51. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-36-51>

Поступила: 26 октября 2021 г. **Принята:** 10 декабря 2021 г. **Опубликована:** 15 декабря 2021 г.

Population pharmacokinetics analysis in Lixoft Monolix softwares

Platova AI

The Mental Health Research Center (MHRC), Moscow, Russia

Abstract. The article has discussed a step-by-step algorithm for developing population pharmacokinetics models in the Lixoft Monolix software. Features of population pharmacokinetics study's methodology have described. Special attention is paid to the advantages of the compartmental approach and nonlinear mixed effects modeling in study of pharmacokinetics. Methods for estimating population pharmacokinetic parameters and its implementation in software are described.

Keywords: Monolix; NLMEM; SAEM; MCMC; Bayesian functional; MLE; PK; PPK

For citations:

Platova AI. Population pharmacokinetic analysis with Monolix software. Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics. 2021;(3): 36–51. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-3-36-51>

Received: October 26, 2021. **Accepted:** December 10, 2021. **Published:** December 15, 2021

Введение / Introduction

Популяционная фармакокинетика (ПФК), исследуя межиндивидуальную вариацию кинетики препарата, изучает вклад в её структуру различных факторов (ковариат), что особенно важно для оценки фармакокинетических (ФК-) параметров в зависимости от индивидуального набора характеристик пациента. В свою очередь индивидуальные ФК-параметры позволяют моделировать динамику концентрации препарата, в том числе в эффекторных тканях и, таким образом, предсказывать степень эффекта и выраженность побочных реакций у отдельного пациента. Таким образом, ПФК предоставляет основу для решения центральной практической задачи — индивидуализации терапии.

Оценка ФК-параметров по концентрации препарата в тест-ткани может быть основана на зависимости, описывающей камерный принцип распределения препарата в организме (компаратментный анализ — КА), или же быть независимой от какой-либо модели (некомпаратментный анализ — НКА). Второй метод оценки требует наличия полного профиля «концентрация–время», что ограничивает его применение в клинической практике.

Зависимость концентрации (как переменной выхода модели) от времени (как переменной входа, иначе называемой регрессором или предиктором) всегда носит нелинейный характер. При этом анализ этой за-

висимости сводится к нахождению ФК-параметров как коэффициентов регрессионной модели. В то же время считается, что сами ФК-параметры характеризуются логнормальным распределением, причём их зависимость от ковариат также нелинейна по своей природе. Из этих рассуждений становится понятно, почему задачи ПФК так или иначе сводятся к нелинейному моделированию.

Факторы, влияющие на кинетику конкретного препарата, могут быть самыми разными: например, параметры биохимического анализа крови, антропометрические данные (пол, масса, возраст), наличие сопутствующей патологии, особенности образа жизни и т. д. Разумеется, заранее предсказать набор связанных с ФК факторов и спланировать сбалансированный по всем ним эксперимент невозможно. Поэтому адекватное изучение ПФК возможно лишь с помощью моделей смешанных эффектов, когда исследуют как фиксированные (популяционные средние ФК-параметров — θ и связанные с ними коэффициенты вносящих в дисперсию вклад ковариат), так и случайные факторы (компоненты модели, отражающие необъяснённую часть вариации: межиндивидуальную вариацию ФК-параметров и остаточную вариацию).

В статистике под популяцией понимают генеральную совокупность пациентов, все свойства которой должны быть отражены в выборке — если последняя репрезентативна. Как объект изучения ФК популяция

может быть представлена группой пациентов или здоровых добровольцев, причём быть как однородной, так и разнородной по набору и разбросу индивидуальных характеристик [1].

Оценки параметров распределения (например, среднее или среднеквадратичное отклонение — SD) ФК-параметров, как и любых случайных величин, могут быть получены 2 методами — моментов и максимального правдоподобия. Метод моментов основан на выборочном методе и заключается в нахождении неизвестных параметров распределения путём замены истинных величин их выборочными аналогами. Этот метод требует репрезентативности выборки. Метод максимального правдоподобия (ММП), свободный от требования репрезентативности выборки, тем не менее гарантирует состоятельность, асимптотическую несмещённость (а для некоторых законов распределения и эффективность) оценок параметров, что объясняет его превосходство перед «традиционными» статистическими приёмами. Преимущества ММП долгое время не могли быть использованы из-за более сложных расчётов, поэтому ММП стал активно применяться лишь с появлением и внедрением компьютерных технологий.

Улучшенный стохастической аппроксимацией EM-алгоритм (SAEM¹), реализованный в программе Lixoft Monolix, позволяет получать для ФК-параметров максимально вероятностные популяционные оценки без какого-либо предположения об их типе распределения. Дополнительная реализация методов Монте-Карло с марковскими цепями (MCMC) позволяет рассчитывать матрицу Фишера для оценки индивидуальных ФК-параметров при ковариации параметров модели и даже при скудной сходимости итерационного алгоритма. Встроенный в Monolix байесовский функционал увеличивает точность предсказаний за счёт уже накопленной по кинетике препарата информации и позволяет оценивать индивидуальные ФК-параметры при максимально разреженных данных — наличии всего одного наблюдения (рис. 1). Вышеперечисленные алгоритмы определили Monolix как оптимальный софт для ПФК-моделирования, в особенности в ТЛМ [3].

¹ SAEM — метод максимизации математического ожидания (EM-метод) со стохастической аппроксимацией (от англ. «stochastic approximation expectation maximization»), применяющийся для реализации ММП. EM-метод (алгоритм максимизации ожидания) — итерационный масштабируемый алгоритм для нахождения максимума функции правдоподобия для параметров вероятностных моделей при решении задач со скрытыми переменными, EM-метод помогает разделять смеси нормальных распределений. При этом ФК-параметры можно оценивать без линеаризации данных. SAEM дополнительно улучшает сходимость даже при постоянном и небольшом объёме симуляции, а также использует информацию о всех данных на всех предшествующих итерациях.



Рис. 1. Байесовская оценка параметров в ФК-проекте [2]
Figure 1. Bayesian parameter estimation in a typical PK project [2]

Популяционная фармакокинетика как научная дисциплина / Population pharmacokinetics as a science subject

Целью фармакотерапии является достижение целевого терапевтического эффекта при минимизации побочных реакций. Влияние лекарственного средства (ЛС) на организм изучается фармакодинамикой (ФД). Обычно это воздействие опосредуется рецепторным взаимодействием, уровень которого определяется концентрацией препарата в целевой (таргетной) ткани. При этом для достижения и контроля терапевтического эффекта необходимо обеспечивать пребывание концентрации препарата в целевой ткани в пределах определённого диапазона. С другой стороны, препарат подвергается воздействию со стороны организма, включающего процессы абсорбции, распределения, биотрансформации (метаболизма) и выведения (экскреции), составляющему предмет изучения фармакокинетики (ФК). Оценить динамику этих процессов у человека можно лишь косвенно, путем моделирования, основанного на имеющихся сведениях о концентрации ЛС в тест-ткани (играющих роль выходов системы)².

Как и любая научная дисциплина ФК сначала накапливает информацию, проходя путь от частного к общему, а затем применяет выявленные закономерности, двигаясь от общего к частному. Второй, дедуктивный метод, решает важную практическую задачу, позволяя предсказывать концентрацию препарата у отдельного пациента, с учётом режима дозирования и индивидуальных характеристик, и затем прогнозировать терапевтический отклик, что позволяет осуществлять персонализацию терапии. Это моделирование целиком базируется на достижениях популяционной фармакокинетики (ПФК) [4].

ПФК как научная дисциплина изучает:

1) взаимосвязи ФК-параметров с индивидуальными характеристиками (ковариатами);

² Используемые в ФК формулы (модели) — это выраженные в математической форме представления о реально протекающих процессах, отражающих функционирование системы «организм — лекарство».

2) влияние последних на межиндивидуальную вариацию ФК-параметров;

3) остаточную (необъяснимую часть) вариации ФК-параметров [5, 6]. Таким образом, ПФК акцентирует внимание на той части вариации параметров кинетики в популяции, которая связана с ковариатами, рассматриваемыми в качестве предикторов [1]. ПФК наряду с ТЛМ [7] является одним из основных инструментов персонализированной медицины [8].

Вопросы ПФК рассматриваются в русскоязычных [9–12] и иностранных [2] источниках. В настоящее время методические рекомендации по изучению ПФК включены в рекомендательные базы США [6] и Евросоюза [1]. Очевидна необходимость создания соответствующих руководств в России.

ПФК-исследования изучают распределение и межиндивидуальную вариацию кинетических параметров, влияние на них индивидуальных предикторов, изменение кинетики во времени (например, при многократном приёме), а также направлены на обнаружение субпопуляций пациентов с отклоняющимися ФК-параметрами [11, 13]. При этом ПФК-исследования в основном проводятся в двух случаях. Первый — когда для выхода на рынок (регистрации) нового препарата необходимо изучить его ФК у особых групп пациентов (с нарушением почечной и/или печёночной функции). Второй случай составляют зачастую проводимые в одном центре разрозненные постмаркетинговые наблюдательные исследования [14].

Изучение ПФК ограничивается не только со стороны финансов, но и применяемыми математическими подходами. Для выявления влияния какого-либо фактора на кинетику препарата у пациентов, у которых одновременно и в различных комбинациях присутствуют и другие потенциальные предикторы, необходимо, в первую очередь, учесть смешанный характер воздействия всех этих факторов. Применение устоявшихся (фрек-

вентивистских) математических подходов для решения подобной задачи является ошибкой, а полученные при этом результаты не отражают реальное состояние изучаемого явления. Развитие компьютерных технологий способствовало активному внедрению методов ММП в сферу биомедицинских исследований, открывая новые возможности в изучении ПФК-закономерностей. Так, реализация методов нелинейного моделирования смешанных эффектов (NLMEM), улучшенных алгоритмом SAEM и байесовским функционалом, в программе Monolix, позволяет даже в малых и ненормированных выборках выявлять зависимость фармакокинетики от индивидуальных характеристик [3, 15].

Подходы к ФК-анализу / Approaches to PK analysis

Оценка ФК-параметра, как и любой случайной величины, означает нахождение характеристик её распределения. Экспериментальные методы оценки популяционных ФК-параметров можно разделить на три подхода: традиционный, стандартный 2-этапный и NLMEM (рис. 2).

Традиционный метод объединения данных в единый пул (naive pooling). Вычисляются средние величины концентраций образцов, забранных у разных индивидов в одно и то же время после приёма препарата, по этим значениям строится одна эмпирическая кривая, ФК-параметры которой признают усреднёнными оценками для всей выборки. Этот подход часто применяется в доклинических исследованиях, когда у каждого животного возможен забор только одной пробы крови. Метод не позволяет оценить индивидуальные ФК-параметры и характеристики их распределения [11].

Стандартный двухэтапный — самый распространённый в ФК-исследованиях метод, дающий на 1-м этапе точные оценки индивидуальных параметров кинетики, для чего необходимо располагать полным профилем

Традиционный метод (naive pooling).

Стандартный двухэтапный ФК анализ: некомпартментный или компартментный

Моделирование смешанных эффектов: линейное (WinNonLin) и нелинейное (NonMem, Monolix)

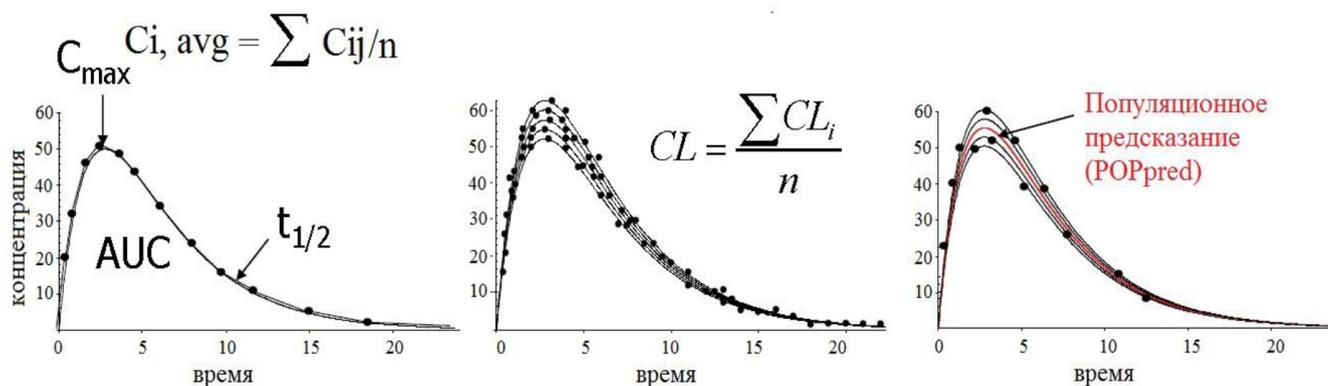


Рис. 2. Методы оценки популяционных ФК-параметров
 Figure 2. Methods for estimating population PK parameters

«концентрация—время» для каждого индивида. На 2-м этапе для этих параметров оценивают выборочные характеристики распределения, которые затем экстраполируются на генеральную совокупность (популяцию в целом). Для применения этого подхода в каждом индивидуальном ФК-профиле должно быть достаточно ФК-заборов. Например, при перорально приёме препарата для НКА необходимо как минимум 3 забора тест-ткани в фазе абсорбции, ещё 3 около времени достижения C_{max} и 5 заборов в фазе элиминации [16]. Для камерного (частевого) анализа для идентификации M параметров модели необходимо не менее M измерений уровня препарата у каждого индивида [11, 17]. Поэтому, стандартный двухэтапный метод не применим для анализа данных ТЛМ. В отличие от NLMEM, основанном на ММП, характеристики распределения в стандартном 2-этапном методе находят более простым и менее точным методом моментов.

Нелинейное моделирование смешанных эффектов (факторов). Модели могут быть с фиксированными эффектами, со случайными эффектами и со смешанными эффектами. Они также могут быть линейными и нелинейными, и, конечно, все эти типы встречаются в разных комбинациях. Модели со смешанными эффектами имеют преимущества перед другими типами. Так как зависимость концентрации от времени или ФК-параметров имеет нелинейную природу, оценивать её можно или после линеаризации, или применяя нелинейное моделирование. Поэтому, несмотря на то что в изучении структуры межиндивидуальной вариации могут применяться разные математические методы, в последнее время под ПФК-анализом понимают комплекс приёмов, основанных на NLMEM [1].

Модели смешанных эффектов включают фиксированные и случайные факторы. В ПФК-анализе под фиксированными факторами понимают популяционные оценки ФК-параметров, например, объёма распределения или клиренса (Θ). Кроме того, фиксированные факторы содержатся в структуре регрессионной модели в виде ковариат, например: $V = \Theta_1 + \Theta_2 * \text{ИМТ}$, где Θ_1 — среднее той части величины объёма распределения (V), которая не связана с ИМТ, а Θ_2 — среднее коэффициента пропорциональности той доли величины V , которая пропорциональна ИМТ. В ПФК-моделях под случайными факторами понимают компоненты модели, отражающие необъяснённую часть вариации параметров (индивидуальные оценки η и их дисперсии ω^2), а также ошибку модельных предсказаний (индивидуальные остаточные ошибки ϵ и их дисперсия σ^2). Оценки фиксированных и случайных факторов получают, находя максимум функции правдоподобия, при этом также может применяться байесовский функционал [2, 11].

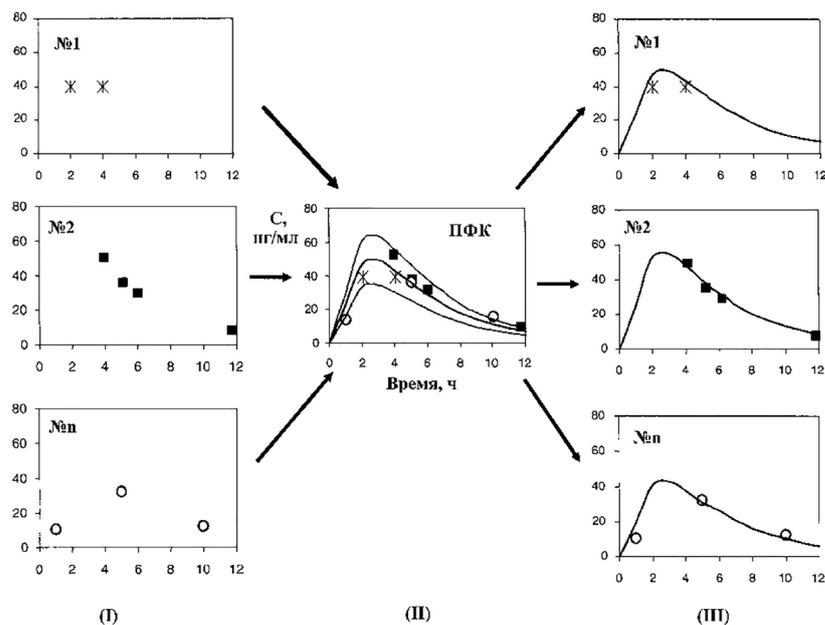
NLMEM позволяет уйти от ограничения, связанного с наличием M измерений для идентификации M параметров модели. В этом случае для полноценного ПФК-анализа достаточно небольшого количества биообразцов, взятых у одного индивида. В общий пул собираются данные профилей «концентрация—время» от разных индивидов (обычно 2–4 ФК-забора), после чего выполняется построение модели, параметры которой отражают популяционные оценки. С учётом последних методы Монте-Карло с цепями Маркова (MCMC) позволяют оценить индивидуальные параметры кинетики, с максимальной вероятностью соответствующие измеренным концентрациям (рис. 3).

Рис. 3. Этапы популяционного ФК-моделирования [12]

Figure 3. Steps of population PK modelling [12]

Примечания: (I) — получение разрозненных данных по концентрации препарата; (II) — построение или уточнение ФК-модели для максимального соответствия имеющимся данным; (III) к моделирование индивидуальных ФК-кривых и расчёт соответствующих индивидуальных ФК-параметров.

Notes: (I) — collecting of sparse drug concentration data; (II) — development or update of the PK model for maximum compliance with the available data; (III) — modeling of individual PK profiles and estimating of the corresponding individual PK parameters.



При оценке вклада, вносимого различными ковариатами в структуру внутри- и/или межиндивидуальной вариации, среди последних выявляют значимые предикторы. При их дальнейшем включении в структуру модели такие случайные факторы становятся фиксированными, создаётся более сложная иерархическая модель, дающая более точные индивидуальные предсказания. При экстраполяции модели на новые данные выполняется её валидация или дальнейшая доработка [2].

Преимущества NLMEM для ФК-исследований / Advantages of NLMEM for PK studies

В отличие от методов линейного моделирования NLMEM позволяет работать с зависимостями нелинейного характера, что принципиально важно при изучении ФК-процессов [18, 19] (табл. 1).

Выявление ФК-предикторов / Identification of PK predictors

Эту основную задачу ПФК можно решать разными методами. Например, можно сравнить распределения ФК-параметров на предмет различий в связи с причинным фактором при условии, что сравниваемые группы однородны по всем другим возможным предикторам. В этом случае достаточно стандартного 2-этапного метода, а сравнение можно выполнить типовыми статистическими тестами. Если же данные собраны в наблюдатель-

ном исследовании или в ТЛМ, т. е. не нормированной по потенциальным предикторам выборке, оценить их влияние на ФК возможно только путём NLMEM. При этом отсутствует необходимость в стандартизации времени пробоотбора, а для выполнения полноценного анализа достаточно забора 1–3 проб у одного индивида

С помощью NLMEM появляются возможности изучения совместного влияния на ФК различных внутренних (антропометрические, физиологические, биохимические факторы, сопутствующая патология) и внешних (курение, социальные факторы, комедикация) факторов. Современные методы ПФК-анализа предоставляют возможность изучения кинетики препарата в разных дозировках, разных режимах дозирования в несбалансированных клинических исследованиях [20].

Как и в любом моделировании (предсказании изучаемого явления), выявление статистически достоверной корреляции предиктора и ФК-параметра ещё не гарантирует 95 % вероятность её подтверждения в другой, более обширной выборке. ПФК-моделирование — это этапный процесс, который начинается с разработки популяционной модели на основе имеющихся, например, литературных данных, и продолжается в виде последующей отладки модели при поступлении новой информации. При этом, как в любом моделировании, основная ценность этого процесса заключается не столько в максимальном приближении к фактическим данным, сколько в практической актуальности модели [2].

Таблица 1

Сравнение традиционного и популяционного ФК-анализа

Table 1

The comparison of traditional pharmacokinetic evaluation and population pharmacokinetic approach

Традиционный ФК-анализ (линейные модели фиксированных эффектов)	Популяционный ФК-анализ, основанный на нелинейных моделях смешанных эффектов
Традиционные статистические тесты, основанные на точечных и интервальных оценках, например: критерии Стьюдента, Пирсона, Спирмена, ANOVA, ANCOVA	Статистики, основанные на ММП, например: критерии LRT, Вальда. Возможно включение байесовского функционала
Достаточное (большое) число фармакокинетических заборов (более 10) у одного индивида	Ненормированное время и малое число образцов (достаточно 2–4)
Часто небольшие исследования в группах, однородных по всем факторам, не подлежащим тестированию	Исследования с несбалансированными выборками или объединённый пул данных нескольких исследований
Заранее спланированное сравнение групп по определённым (фиксированным) факторам, количество факторов ограничено	Возможно выявление действия случайного фактора и последующее включение его в модель. Количество возможных предикторов не ограничивается
Результаты экстраполируются на генеральную совокупность, хотя данные получены на выборке, однородной по не интересующим исследователя предикторам	Нет критериев отбора по действующим факторам, поэтому экстраполяция на генеральную совокупность более правомерна
Нечастевой анализ является рекомендованным стандартом	Данные формализуются моделью, нечастевой анализ не применяется
Всегда проспективное исследование с жёсткими критериями отбора, зачастую требующее предварительного одобрения регуляторными органами	Исследование может быть наблюдательным и ретроспективным. Максимально широкие критерии отбора, соответствующие реальной практике (разнородная популяция пациентов)
Софт: WinNonlin, Kinetica и др.	Софт: R-statistics, NONMEM, Lixot Monolix

Некомпаратментный и частевой ФК-анализ / Noncompartmental and compartmental PK analysis

Существует два подхода к определению параметров ФК: компартментный и некомпаратментный. В компартментном (КА, также называемом частевым или камерным) анализе схему «организм/лекарство» рассматривают как совокупность камер, между которыми и внутри которых происходят процессы распределения, превращения и выведения ЛС. Некамерный (некомпаратментный, нечастевой, модель-независимый, НКА) анализ рассматривает ФК-графики как кривые плотности распределения молекул лекарства по времени их пребывания в анализируемой среде и применяет для их анализа метод расчёта статистических моментов нулевого (AUC), первого (MRT, среднее время удержания ЛС в организме) и второго порядков (VRT, дисперсия среднего времени удержания) [21].

В основе НКА и частевого анализа лежат разные вычислительные методы. В НКА по фактическим профилям «концентрация–время» сначала находят следующие величины: AUC_t , T_{max} , C_{max} и λ_z , а параметры AUC_{inf} , $V_{z/F}$, $Cl_{z/F}$, AUC_{inf} и $T_{1/2}$ рассчитывают уже как производные от дозы, λ_z и AUC_t величины [9, 22]. В камерном анализе исходно рассчитываемыми параметрами — на примере 1-камерной ФК и внесосудистого введения — становятся константы элиминации (K_{el}), абсорбции (K_a) и объём распределения (V_d) или клиренс (Cl), что устанавливается формулой модели. В НКА функция $C(t)$ предполагается неизвестной, и для расчёта ФК-параметров в любом случае необходим полный кинетический профиль. В камерном подходе функция $C(t)$ может описываться различными формулами в зависимости от свойств кинетики препарата. Сопоставление методов расчёта ФК параметров при НКА и камерном подходе (на примере 1-камерной модели) приведено в табл. 2, составленной с помощью базовых руководств по ФК [23–25].

Некамерный анализ / Noncompartmental analysis. Для расчёта AUC_t и $AUMC_t$ применяется трапецидальный метод (линейный или логарифмический), а для расчёта терминальной константы элиминации (λ_z) — регрессионный анализ. Последний выполняется для участка ФК-профиля, соответствующего финальному моноэкспоненциальному снижению концентрации [24]. Основываясь на трапецидальном методе, НКА нуждается в наличии полных профилей «концентрация–время». Этот метод ФК-анализа в настоящее время остаётся основополагающим при проведении доклинических и клинических исследований ЛС, что закреплено в международных и отечественных методических рекомендациях. В частности, при проведении исследований БЭ и I фазы необходимо применение именно НКА. Это обстоятельство во многом объясняется простотой лежащих в его основе математических методов.

НКА основан на допущении линейности кинетических процессов, их независимости от времени, а также предположении, что элиминация препарата происходит только из центральной камеры, что для многих препаратов является сильным упрощением [11].

Частевой анализ / Compartmental analysis. ФК-процессы так или иначе не могут быть непосредственно изучены в организме человека. Поэтому, для представления о количестве и концентрациях ЛС в разных органах и тканях организма, так или иначе, необходима модель. Фармакокинетическая модель — это система дифференциальных уравнений, с помощью которых можно предсказать концентрацию ЛС в ткани в различные моменты времени. Частевой анализ всегда руководствуется выбранной моделью (и лежащей в её основе формулой), которая описывает процессы абсорбции, метаболизма, распределения между камерами и выведения ЛС [26]. В этом случае выполняется подгонка (фиттинг) выбранной модельной зависимости для максимального приближения к фактическим профилям «концентрация — время». Этот процесс обычно осуществляется с применением итеративного алгоритма. Правдоподобие и точность полученных оценок ФК-параметров зависят от выбранной структурной модели. Очевидно, что чем ближе предсказанные и измеренные концентрации, тем выше качество модели. Задача выбора ФК-модели, наиболее точно описывающей кинетику препарата, максимально эффективно решается с помощью NLMEM.

Широко известным частевым подходом, является реализованный в WinNonlin, метод Гаусса–Ньютона в модификации Левенберга [27]. Однако отсутствие возможности выбора между различными моделями представляет существенный недостаток этого метода. Например, для перорального введения предусмотрено большое число разных моделей: 1-камерная с константой абсорбции 0-го порядка и константой элиминации 1-го порядка, 1-я камерная с константой абсорбции 1-го порядка и элиминацией, подчиняющейся закону Михаэлиса–Ментен, кроме того, существуют различные варианты 2-камерных или 3-камерных моделей. Раньше единственным инструментом, позволяющим в той или иной мере адекватно судить о типе процессов абсорбции и элиминации препарата в организме, была визуализация графиков «концентрация–время» в полулогарифмических координатах, что весьма ограничивало возможности исследователей.

Преимущество НКА заключается в отсутствии необходимости в спецификации частевой модели для анализа данных, что отражает сферу его применения: доклинические исследования, исследования I фазы, когда нет исходных данных о ФК ЛС, а также в исследованиях БЭ, когда выбор модели не должен оказывать влияние на результаты.

Частевой анализ имеет преимущества в исследованиях ПФК; оценки баланса масс (т. к. иными методами такая оценка невозможна); при моделировании ФК с целью подбора режима дозирования; для описания

Таблица 2

Сравнение методов расчёта ФК-параметров в некамерном и камерном подходе (при внесосудистом введении)

Table 2

The comparison of calculating PK parameters methods in noncompartmental and compartmental approach (after extravascular administration)

Параметр	НКА	КА (на примере 1-частевой модели)
Первичные ФК-параметры*	AUC _t , λ _z , T _{max} и C _{max} , AUMC _t , эмпирическая функция C(t)	K _a , K _{el} , V _d – по заданной частевой моделью формуле C(t)
Вторичные ФК-параметры*	AUC _{inf} , AUMC _{inf} , Cl, Vz, MRT, T _{1/2}	AUC, AUM, Cl, T _{1/2} , T _{max} , C _{max} , MRT
AUC _t	Трапецеидальный метод: $AUC_t = \sum (t_i - t_{i-1}) * \frac{(C_i + C_{i-1})}{2}$	По формуле модели: $AUC_t = \int_0^t C(t) dt$
C(t)	Задаётся фактическим измерением	Задаётся как формула частевой модели: $C(t) = \frac{Dose * F}{V_d} * \frac{K_a}{K_a - K_{el}} * \exp^{-K_{el} * t}$
K _a	Не рассчитывается	Графический метод (метод остатков), МНК или ММП
Константа элиминации λ _z в НКА и K _{el} в частевом анализе	На основе логлинейной регрессии с помощью МНК	Графический метод (метод остатков), МНК или ММП
C _{max}	Эмпирически	$C_{max} = \left(\frac{F * D}{V_d} \right) * \exp^{-K_{el} * T_{max}}$
T _{max}	Эмпирически	$T_{max} = \ln(K_a / K_{el}) / K_a - K_{el}$
AUC _{inf}	AUC _t + Clast/λ _z	По формуле модели: $AUC_{inf} = \int_0^{\infty} C(t) dt$
AUMC _t	Вычисляется по правилу трапеций	По формуле модели: $AUMC_t = \int_0^t tC(t) dt$
V _d в частевом анализе и V _z в НКА	$V_z = \frac{Dose * F}{AUC_{inf} * \lambda_z}$	$V_d = \frac{D * F}{AUC_{inf} * K_{el}}$
Cl	$Cl = \frac{Dose * F}{AUC_{inf}}$	$Cl = V_d * K_{el}$
T _{1/2}	$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda_z}$	$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{K_{el}}$
MRT _{inf}	$MRT_{inf} = \frac{AUMC_{inf}}{AUC_{inf}} = \frac{AUMC_t + \frac{T_{last} * C_{last}}{\lambda_z} + \frac{C_{last}}{\lambda_{z2}}}{AUC_{inf}}$	$\frac{AUMC_{inf}}{AUC_{inf}} - \frac{1}{K_a} = \frac{\int_0^{+\infty} tC(t) dt}{\int_0^{+\infty} C(t) dt} - \frac{1}{K_a}$

Примечания: * – первичные ФК-параметры, лежащие в основе расчёта остальных параметров; D – доза; F – величина биодоступности при приёме внутрь; МНК – метод наименьших квадратов; ММП – метод максимального правдоподобия; MRT_{inf} – среднее резидентное время, экстраполированное до бесконечности; AUMC_{inf} и AUMC_t – площади под кривой, формируемой временем и величиной произведения времени и концентрации, т. е. первый момент интеграла кривой «концентрация-время», экстраполированной до бесконечности (AUMC_{inf}), или рассчитанный для интервала времени 0–t (AUMC_t); C_t – последняя измеренная ненулевая концентрация; T_{last} – время измерения последней ненулевой концентрации.

Notes: * – the primary PK parameters underlying the computation of other parameters; D – dose; F – the value of bioavailability after oral administration; МНК – the method of least squares; ММП – the maximum likelihood method; MRT_{inf} – mean residence time extrapolated to infinity; AUMC_{inf} and AUMC_t – the areas under the curve formed by time and the product of concentration and time, i. e. the area under the first moment of integral for concentration–time curve extrapolated to infinity (AUMC_{inf}) or calculated for the time interval 0–t (AUMC_t); C_t – the last measured non-zero concentration; T_{last} – the measurement time of the last non-zero concentration.

Математические алгоритмы, применяющиеся для ФК-анализа

Table 3

Mathematical algorithms used for PK analysis

Метод	Описание и программное обеспечение
Традиционный стандартный двухэтапный метод	1-й этап: на основе полного профиля «концентрация–время» для каждого индивида рассчитываются ФК-параметры. 2-й этап: выборочные оценки экстраполируют на популяцию (например, при исследованиях БЭ). Софт: Резольвента, WinNonlin, Kinetica [22]
Глобальный двухэтапный метод	Кроме приёмов стандартного 2-этапного метода дополнительно производится учёт ковариации ФК-параметров, что позволяет улучшать точность ФК-модели [28]
Итеративный 2-этапный метод (IT2S)	Кроме приёмов стандартного 2-этапного метода дополнительно тестирует влияние факторов, ММП с итеративным подходом. Софт: WinNonlin [29]
Линейное моделирование смешанных эффектов	Использует методы ММП и нелинейное моделирование. Софт: WinNonlin [22]
MAP (от англ. «maximum a posteriori») – метод оценки с помощью апостериорного максимума	ММП с байесовским функционалом реализуется итеративным механизмом. Софт: USC*PACK, NONMEM [15, 30]
Непараметрический метод максимального правдоподобия (NPLM)	ММП осуществляет построение дискретной совместной плотности распределения параметров, например, 3-мерное пространство распределения для K_{el} , Cl , V , что позволяет визуально выделять субпопуляции пациентов. Софт: модуль NPEM в USC*PACK, полунепараметрическая процедура «NLMIX» в SAS [30, 31]
NLME	Оценка ФК-параметров проводится ММП, основанного на алгоритмах FOCE ³ или SAEM. Учитывается автокорреляция между ФК-параметрами, возможно выявлять потенциальные предикторы, влияющие на ФК-параметры, сочетается с байесовским функционалом, МСМС. При этом используется аппроксимация нормального распределения ФК-параметров. Софт: NONMEM, Monolix, процедура «NLME» в S-PLUS, процедура «NLINMIX» в SAS [3, 18, 19]

метаболизма ЛС; в случае нелинейности его кинетики (процессы насыщения). Ранее камерный ФК-анализ также требовал наличия полного ФК-профиля, так как базировался на линейном регрессионном анализе. Теперь ММП позволяют определять ФК-параметры и без полного кинетического профиля.

Следует отметить, что существует сопоставимость ФК-параметров, оцениваемых НКА и частевым методами, например величина λ_z , рассчитываемая при НКА, в камерной интерпретации соответствует K_{el} — константе элиминации в рамках 1-частевой модели и гибридной микроконстанте β , отражающей терминальную фазу элиминации β -фазу для 2-камерной модели. При этом величины V_z и Cl_z в НКА отражают кажущийся объём распределения в центральной камере ($V1$) и клиренс (Cl) в случае камерного расчёта, независимо от количества компартментов [24]. Вместе с тем, из-за различий в методологии расчёта этих ФК-параметров в нечастевом и камерном анализе полученные оценки могут существенно сильно отличаться.

Можно заключить, что оба подхода являются взаимодополняющими. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Так, при неизвестном характере ФК, например, в исследованиях I фазы, чтобы исключить какие-либо предположения об описывающей её модели, целесообразно использовать НКА. А для дальнейшего изучения кинетики ЛС в организме

целесообразнее использовать частевой анализ. Таким образом, преимущества НКА заключаются в недостатках камерного подхода и наоборот [24].

Программное обеспечение для популяционного ФК-моделирования / Software for population PK modeling

ПФК исторически применяла разные инструменты для изучения зависимости кинетики препарата от индивидуальных характеристик. Довольно длительное время для выявления различий в ФК между популяциями здоровых добровольцев и пациентов с почечной и/или печёночной недостаточностью использовался стандартный 2-хэтапный метод (в исследованиях I фазы).

ПФК-анализ может быть основан на параметрических и непараметрических методах. И те, и другие успешно сочетаются с байесовским функционалом, а также методами максимального правдоподобия. В табл. 3 приведены основные методы ПФК-анализа и программы, в которых они реализованы.

³ FOCE — метод проверки условия первого порядка (от англ. «first order conditional estimation»), выполняет линейризацию первого порядка функции регрессии по отношению к случайным эффектам (в нелинейных моделях смешанных эффектов).

Компьютерная реализация линейного, а затем и нелинейного моделирования смешанных факторов открыла возможности более эффективного решения задач ПФК, которая прошла путь от элементарного тестирования гипотез до NLMEM с реализацией методов максимального правдоподобия (ММП).

В настоящее время оптимальным алгоритмом, применяющим ММП в исследованиях ФК, можно назвать SAEM. Изначально разработанный для программы Lixoft Monolix, этот алгоритм сейчас реализован в программах NONMEM, R-statistics (пакет saemix) и Matlab (как функция nlmefitsa.m). Хотя, в ПФК-исследованиях «золотым стандартом» по-прежнему остаётся программа NONMEM, в настоящее время Monolix уступает лишь её версии 7.0 в части реализации непараметрических методов [2, 15, 32, 33].

Алгоритм популяционного моделирования / Population modeling algorithm

Для популяционного фармакокинетического анализа предназначена специализированная программа Monolix® v.4.2 (Lixoft, Франция), от франц. «MOdèles On LInéaires à effets miXtes» — нелинейное моделирование смешанных эффектов (рис. 4).

Доза, интервал дозирования, наряду со значениями концентрации и времени её измерения, а также индивидуальные характеристики участников исследования, явно задаются в исходном массиве данных.

Построение популяционных моделей для обеспечения независимости выполняется без какого-либо изначального предположения о популяционных характеристиках, т. е. без байесовского функционала.

Популяционный фармакокинетический анализ включает следующий пошаговый алгоритм:

- 1) определение структуры ФК-модели;
- 2) изучение типа распределения остатков;
- 3) вычисление популяционных характеристик;
- 4) вычисление индивидуальных ФК-параметров с тестированием влияния ковариат, оценка ошибок фиксированных (популяционных оценок – Θ) и случайных эффектов (матрица Ω величин η);
- 5) проверка стабильности итоговой модели.

Подбор структурной ФК-модели / Selection of the structural PK model

Определение структурной ФК-модели, лучше всего соответствующей измеренным концентрациям, основано на максимизации её предсказательной ценности нахождением максимума функции правдоподобия, который соответствует минимальным значениям информационных критериев: Байеса (BIC), Акаике (AIC) и собственно величины « $-2LL$ »⁴. Дополнительно предсказательная ценность модели оценивается визуально

⁴ Информационный критерий – мера относительного качества статистической модели, характеризующая точность описания моделью фактических экспериментальных данных. Эти критерии применяются в методе максимального правдоподобия и рассчитываются на основе функции правдоподобия (L) по формулам: $AIC = 2P - 2 \cdot \ln(L)$, где P – общее количество параметров, оцениваемых моделью (например, для 2-частевой модели их 5: K_a , CL, V_1 , Q и V_2); $BIC = \ln(N)P - 2 \times \ln(L)$, где P – общее количество параметров, оцениваемых моделью, а N – число субъектов; $-2LL$ – лог-производная функции правдоподобия: $-2 \cdot \ln(L)$. Очевидно, что чем больше правдоподобие – тем меньше величина $-2 \cdot \ln(L)$, и, соответственно, меньше величина информационных критериев.

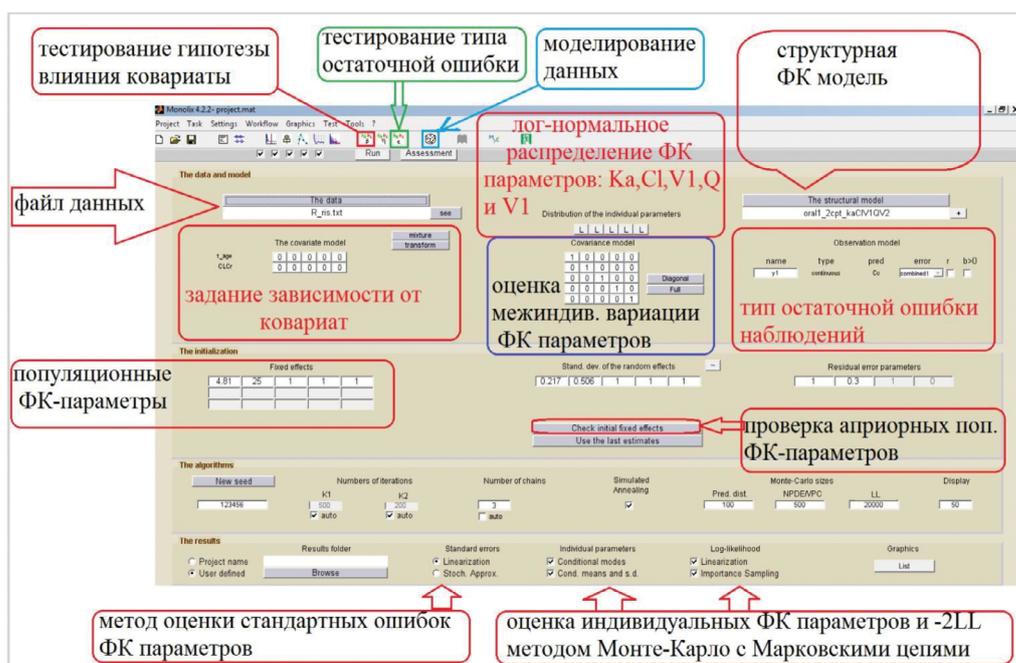


Рис. 4. Рабочее окно программы Monolix v.2.4
Figure 4. The Monolix v. 2.4 program window

по графику регрессии индивидуальных предсказанных и полученных наблюдений, диаграммы рассеяния IWRES (взвешенных остатков индивидуальных прогнозов) по времени, а также с помощью диаграмм визуальной проверки (VPC) и численного метода проверки предсказательности модели (NPC).

Подбор структурных ФК-моделей проводится поэтапно при равномерном распределении остатков: сначала подбирается количество компартментов (камер), затем характер абсорбции и элиминации. Структурные ФК-модели представляют собой дифференциальные уравнения, описывающие динамику количества лекарства в компартменте и, соответственно, позволяющие получать её предсказания (рис. 5).

Предсказательная ценность выбранной модели должна быть валидирована по графику VPC, показывающему соотношение теоретических и эмпирических

процентилей (наблюдаемые данные/измеряемые концентрации). Теоретические проценти́ли (моделируемые данные) вычисляются путём многократной симуляции методом Монте-Карло с использованием интересующей модели и структуры исходного набора данных (режим дозирования и время измерения концентрации). Интервалы прогнозирования для каждого проценти́ля отображаются в виде цветных областей (розовый — для 50-го проценти́ля, синий — для 10-го и 90-го проценти́лей). Если модель верна, наблюдаемые проценти́ли должны быть близки к предсказанным и оставаться в пределах вышеуказанных интервалов. Красным цветом показаны выбросы фактических наблюдений, не попадающие в предсказанные доверительные интервалы. Примеры хорошего и плохого графиков VPC, при моделировании активной антипсихотической фракции рисперидона (рисперидон +

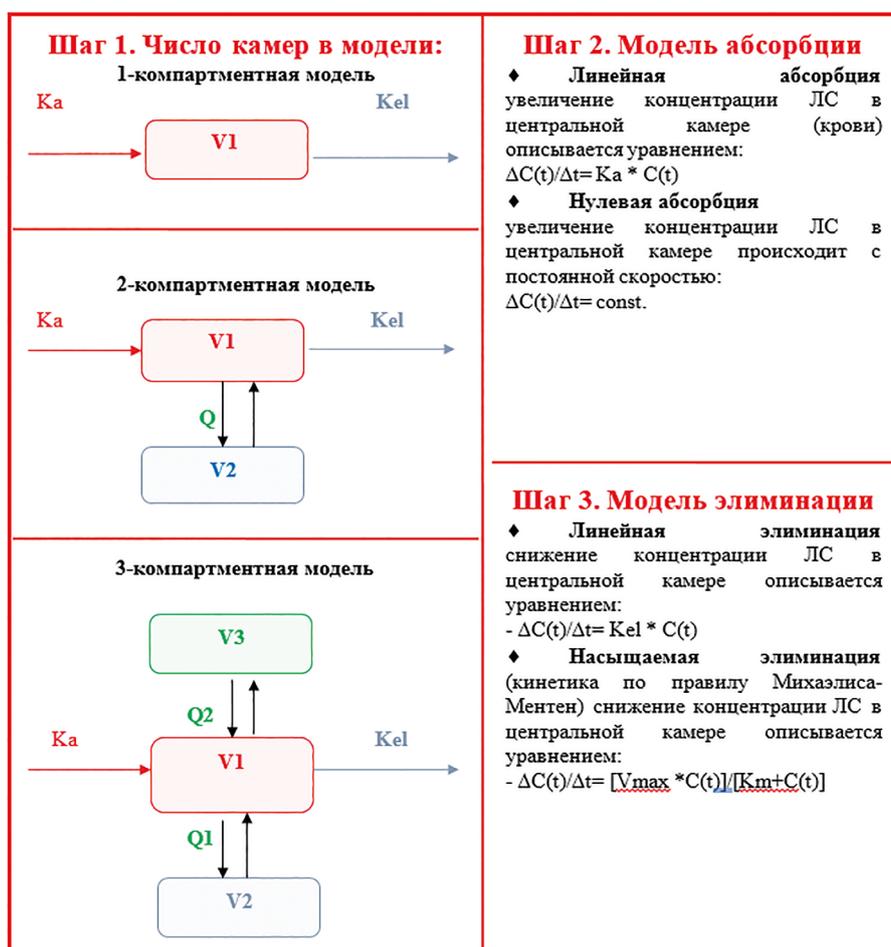


Рис. 5. Основные ФК-модели, соответствующие пероральному приёму препарата

Figure 5. The main PK models corresponding to oral drug administration

Примечания: V1 – объём распределения в центральной камере, V2 и V3 объёмы распределения в периферических камерах; K_a – константа абсорбции; K_{el} – константа элиминации; Q – межкамерный клиренс; V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции; K_m – константа Михаэлиса; $\Delta C(t)/\Delta t$ – производная графика «концентрация-время» в точке t, отражающая скорость изменения концентрации в этой временной точке; C(t) – концентрация лекарства в крови в момент времени t.

Notes: V1 – volume of distribution in the central compartment, V2 and V3 – volumes of distribution in the peripheral compartments; K_a – absorption rate constant; K_{el} – elimination rate constant; Q – inter-compartmental clearance; V_{max} – maximum rate of the enzymatic reaction; K_m – the Michaelis constant; $\Delta C(t)/\Delta t$ – derivative of the concentration-time curve at point t, reflecting the rate of concentration change at this time point; C(t) – drug concentration in the blood at time t.

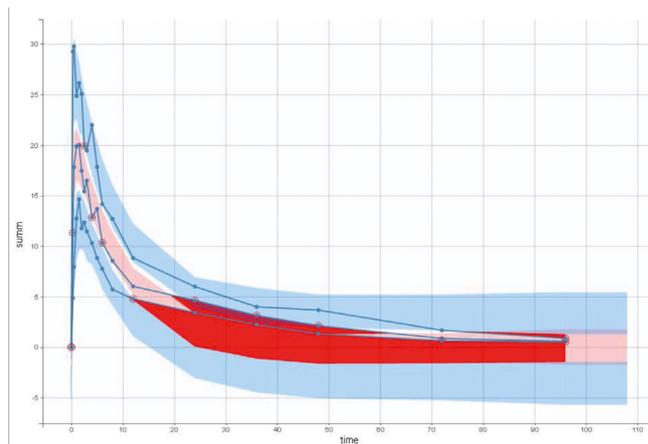
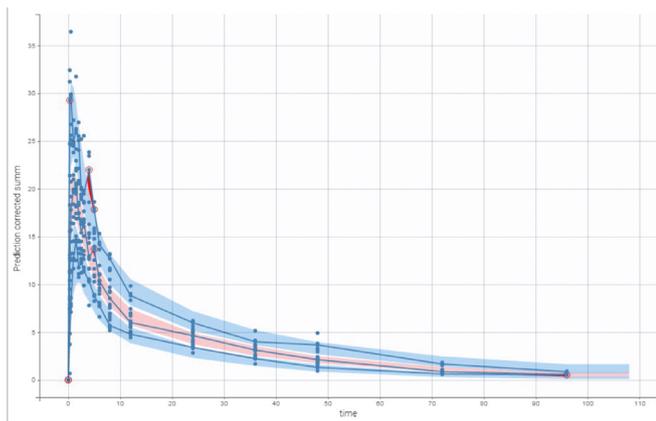


Рис. 6. Примеры приемлемого (вверху, при применении 1-частевой модели) и неприемлемого (внизу, при применении 2-частевой модели) графиков VPC

Figure 6. Examples of acceptable (at the top, in applying 1-compartment model) and unacceptable (at the bottom, in applying 2-compartment model) VPC graphs

активный метаболит 9-ОН-рисперидон), выполненные по данным исследования биоэквивалентности, приведены на рис. 6.

существуют различные типы ошибок, комбинирующие вышеперечисленные компоненты (рис. 7).

Моделирование распределения остатков / Modeling the distribution of residuals

В общем виде концентрация ЛС, измеренная у субъекта i в момент времени j , может быть выражена в виде формулы:

$$Y_{ij} = f(\Theta_i) + \Theta_{ij}, \quad (1)$$

где Y_{ij} – наблюдаемая (измеренная) концентрация у i -го субъекта во время j -того измерения концентрация ЛС; f – модельная функция;

Θ_i – набор (вектор) индивидуальных ФК-параметров (фиксированных эффектов) субъекта i ;

Θ_{ij} – остаточная ошибка, разность между предсказанной и измеренной концентрациями у субъекта i при заборе крови в момент времени j .

Существует несколько паттернов распределения остатков, например, постоянный, пропорциональный, экспоненциальный, комбинированный, есть и более сложные комбинированные типы. Постоянная остаточная ошибка по модулю имеет равномерный характер, не зависит от предсказанной концентрации, отражая лишь «системный шум». Этот тип связывают с погрешностью аналитического метода или отклонениями во времени забора биоматериала. Пропорциональная остаточная ошибка возрастает соразмерно увеличению концентрации, что часто связано с большей вариабельностью K_a , влияющей на уровень максимальных концентраций [34]. Комбинированная остаточная ошибка наблюдается при сочетании причин, характерных для постоянной и пропорциональной ошибок. Экспоненциальный характер распределения остатков может означать взаимосвязь (скоррелированность) остатков ФК-модели (η) и остаточной ошибки концентраций (ϵ) [34, 35]. Также

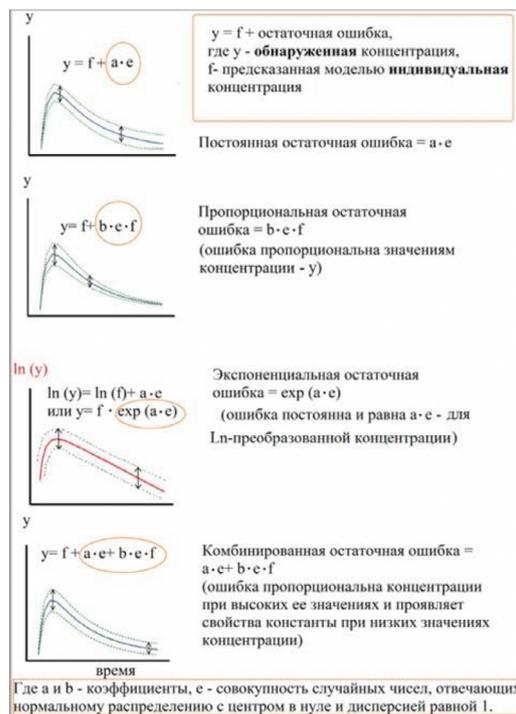


Рис. 7. Моделирование остатков
Figure 7. Modelling the residuals

Установление типа распределения остаточной ошибки выполняется с помощью информационных критериев (AIC, BIC), теста отношения вероятностей (LRT), а также графического анализа диаграммы рассеяния IWRES в зависимости от концентрации. Кроме того, важно исследовать распределение нормализованных остатков (NPDE). Подбор типа распределения

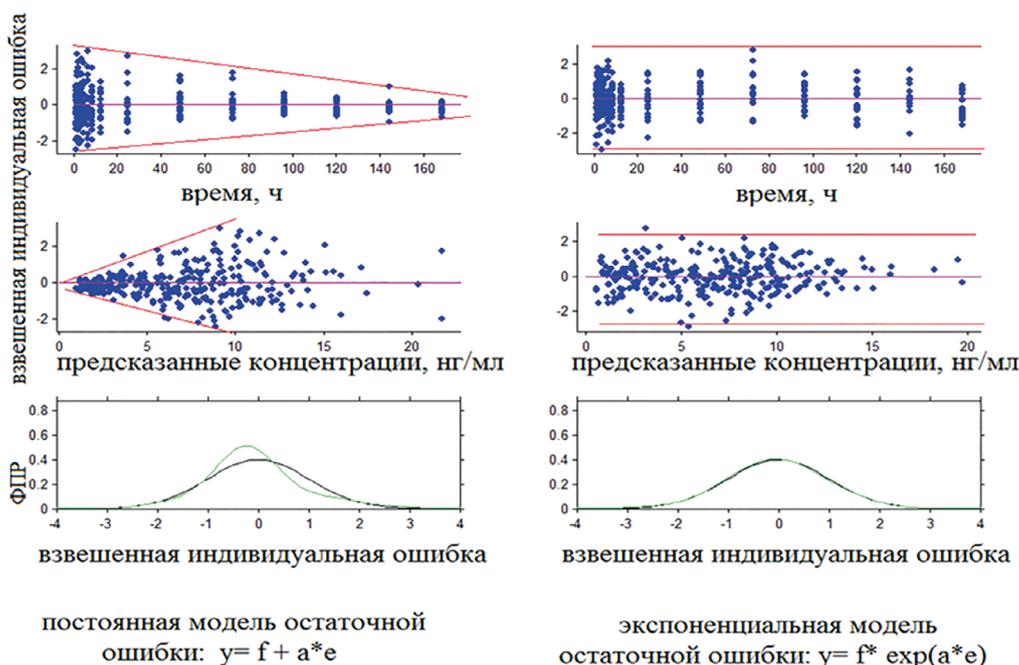


Рис. 8. Распределение взвешенных остатков индивидуальных предсказаний (IWRES) при применении постоянной (слева) и экспоненциальной (справа) моделей распределения остатков

Figure 8. The distribution of individual weighted residuals (IWRES) when applying constant (left) and exponential (right) residuals distribution models

Примечание: ФПР (PDF) – функция предсказанного распределения вероятности.

Note: PDF is a predicted probability distribution function.

остатков выполняется с помощью теста отношения правдоподобия LRT (от англ. «likelihood-ratio test»)⁵ пошаговым сравнением разных распределений, например: постоянная → пропорциональная → экспоненциальная → комбинированная остаточная ошибка. Р-величина теста менее 0,05 означает лучшую точность предсказаний для новой модели. При этом изначальную модель остатков (H0) отклоняют, а тестируемую (H1) принимают. Последнюю далее сравнивают со следующим типом остатков. Тестирование отличия от нуля коэффициентов значимых ковариат выполняется с помощью теста Вальда (test Wald). Оценка объективной функции (правдоподобия) осуществляется с помощью алгоритма SAEM.

Выбор модели ошибки должен основываться на изучении её распределения: ошибка должна быть равномерно распределена — не зависеть от времени ФК-заборов или уровня предсказанной концентрации, кроме того распределение остатков должно быть центрировано в нуле, что определяется при анализе графиков распределения остатков. Примеры хорошего и неудовлетворительного распределения остатков приведены на рис. 8, где слева видна гетероскедастичность и зависимость распределения остатков от времени и уровня концентрации

⁵ Тест отношения вероятностей (LRT) вычисляется по формуле: $LRT = 2 (\log L1 - \log L0)$, где L1 – правдоподобие альтернативной гипотезы, а L0 – нулевой гипотезы; LRT применяется для сравнения правдоподобия двух гипотез.

(данные были получены при моделировании кинетики анастозола 2-частевой моделью после однократного приёма препарата).

Оценка средних ФК-параметров в популяции / Estimation of average PK parameters in the population

Определение популяционных ФК-параметров основано на итерационном алгоритме SAEM (рис. 9).

Во время ряда итераций последовательно подбираются ожидаемые популяционные оценки ФК-параметров, лучше всего характеризующие фактически измеренные концентрации. При этом также определяются линеаризованные стандартные ошибки, откло-

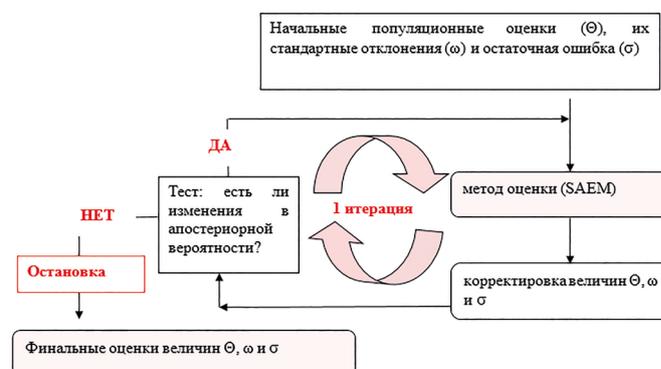


Рис. 9. Схема итерационного процесса SAEM
Figure 9. SAEM iterative process scheme

нения и дисперсии популяционных оценок, а также остатки предсказаний модели.

Получение индивидуальных предсказаний и тестирование влияния ковариат / Obtaining of individual predictions and testing the effect of covariates

Индивидуальные ФК-параметры оценивают с учётом ожидаемых популяционных средних. Вычисление этих параметров проводится как без учёта параметров распределения методом итераций (опция в программе «Conditional mode»), так и с учётом параметров распределения — в комбинации с Марковскими цепями Монте-Карло, по достижении сходимости которых вычисляются условные средние для каждого индивида (опция «Conditional distribution»).

Оценка ошибок фиксированных (популяционных средних — Θ) и случайных эффектов (матрица Ω величин η) проводится методом стохастической (вероятностной) аппроксимации. Изучение межличудивидуальной вариации ФК-параметров (связь индивидуальных ошибок ФК-параметров η с ковариатами) проводится с помощью визуального анализа графиков рассеяния и теста Вальда для выбранных ковариат.

Кроме того, в версии Monolix 2019 появилась возможность дополнительного тестирования ковариат с помощью критерия Пирсона и простого дисперсионного анализа ANOVA. Тестирование взаимосвязи ФК-параметра с ковариатами выполняется при их пошаговом добавлении и удалении. По завершении исследования межличудивидуальной ФК-вариации выполняется построение финальной популяционной модели, учитывающей обнаруженные зависимости.

Тестирование влияния и дальнейшее включение ковариат в модель, прежде всего, должно основываться на предположениях, имеющих физиологический смысл. Как и в обычном регрессионном анализе, важно тестировать возможность взаимосвязи предикторов. Однако, в отличие от него, смешанные модели позволяют включать в модель взаимодействие предикторов без снижения точности предсказаний.

В ФК имеется ряд общих закономерностей. Так, клиренс креатинина (КлКр) отражая почечную функцию, будет коррелировать с клиренсом препаратов, в значительной степени элиминируемых почками. Идеальная масса тела (IBW), отражая массу метаболически активной части организма, может быть предиктором клиренса у препаратов, которые элиминируются в основном путём биотрансформации. Распределение большинства препаратов часто определяется массой, а для липофильных препаратов — индексом массы тела (ИМТ). Отсюда следует целесообразность рассмотрения величин КлКр, массы тела, ИМТ, IBW и BSA, как возможных регрессоров при построении ФК-моделей. Для расчёта этих переменных можно использовать следующие формулы [12]:

$\text{КлКр (мл/мин)} = \frac{1,228 \cdot [140 - \text{возраст}] \cdot \text{вес тела (кг)} \cdot 0,85 \text{ (для женщин)}}{\text{креатинин плазмы (мкмоль/л)}} \quad (2)$
$\text{ИМТ} = \text{масса/рост}^2 \text{ (кг/см}^2\text{)} \quad (3)$
$\text{BSA} = \sqrt{\frac{\text{рост (м)} \cdot \text{вес (кг)}}{3600}} \quad (4)$
$\begin{aligned} \text{IBW} &= 50 + 2,3 (\text{рост в см} - 60) \text{ для мужчин} \\ \text{IBW} &= 45,5 + 2,3 (\text{рост в см} - 60) \text{ для женщин} \end{aligned} \quad (5)$

Влияние предикторов на ФК-параметры оценивается пошаговым алгоритмом: сначала в модель по одной включаются ковариаты с достоверной предсказательной способностью (при $p < 0,05$), а затем тестируется удаление ковариат (в порядке возрастания их предсказательной значимости) (при $p > 0,01$) с помощью критерия отношения вероятностей LRT. Далее с помощью критерия Вальда тестируется значимость коэффициентов фиксированных эффектов/параметров для выбранных ковариат (рис. 10).

Такое последовательное исключение любой переменной, которая перестаёт быть значимой при введении в модель последующей переменной, обеспечивает стабильность финальной популяционной модели. Иногда переменные ФК-предикторов могут требовать дополнительных преобразований (центрирование, лог-преобразование), что может усиливать выявленные зависимости (делать их более тесными).

Стабильность итоговой ФК-модели / Final PK model stability

Стабильность итоговой модели оценивается с помощью внутренней валидации. В модуле «Mlxplote» многократно моделируется (1000 раз) пул данных с параметрами, определёнными в итоговой модели. Стабильность популяционных оценок (медиана — Θ и ω) определяют сравнением величин, полученных на исходных и смоделированных данных. Модель признают стабильной, если эти параметры не имеют статистически значимых различий. 95 % ДИ рассчитывается как величина $\pm 1,96 \times \text{SE}$. Кроме того, прогностическую эффективность разработанных моделей предварительно проверяют по графику VPC.

Заключение / Conclusion

ПФК-анализ помогает выявлять субпопуляции, требующие корректировки дозирования препарата, а также позволяет предсказывать его концентрацию при многократном приёме при учёте индивидуальных характеристик. Это — незаменимый инструмент в реализации принципа персонализированной медицины [36].

Камерный принцип ФК-анализа способствует более качественному пониманию происходящих в

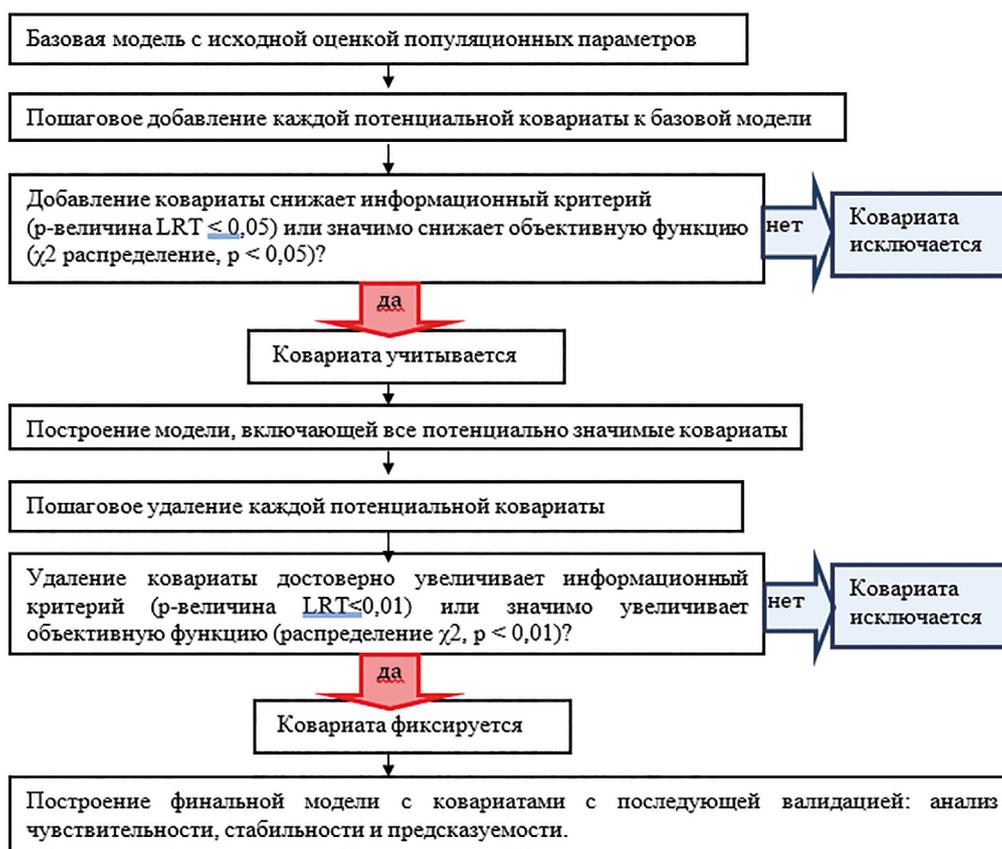


Рис. 10. Алгоритм тестирования ковариат в нелинейном моделировании смешанных эффектов

Figure 10. Algorithm to testing of covariates in nonlinear mixed effects modeling

организме процессов. Популяционное моделирование на основе NLMEM с применением стохастической аппроксимации для алгоритма максимизации ожидания (SAEM) позволяет обнаруживать закономерности и получать оценки даже при использовании сильно разреженных данных (sparse data), например, полученных в ТЛМ.

Наличие бесплатной академической лицензии у программы Monolix позволяет получать качественные научные выводы при минимальных затратах.

Важно отметить, что популяционная модель, как и любая другая, всегда представляет собой некую формулу как универсальный инструмент в познании окружающих человека явлений. Но важно понимать, что и сама модель, и составляющие её регрессионные коэффициенты не являются статической характеристикой изучаемых явлений. Так, выявленные в одной популяции закономерности, могут быть скорректированы и даже не подтверждены в другой выборке, на первой взгляд из такой же популяции. ПФК-исследования зачастую являются поисковыми. Поэтому моделирование ФК требует постоянного притока новых данных с периодическим реанализом всей совокупности данных. Это стало воз-

можно благодаря появлению мощных компьютерных технологий (big data), а также тенденции учёных всего мира к объединению усилий и созданию единых баз данных. В будущем популяционное моделирование с использованием такого объединённого пула данных, собранных от большого числа пациентов позволит создавать сложные и точные иерархические модели. При этом режим дозирования, назначенный пациенту с применением компьютерного моделирования, на основе ввода его персональной информации, позволит получать предсказания ФК и фармакодинамики (ФД) препарата, обеспечивающие максимальную эффективность лечения уже в его начале.

Важно заметить, что выявленные взаимосвязи «ФК-параметр – ковариата» важны и при отсутствии очевидной интерпретации, так как могут служить основой для выявления новых влияющих на ФК триггеров.

Особое значение ПФК-моделирование может иметь при тестировании одновременного влияния на ФК многих факторов. Такие исследования могут проводиться прямо в реальной клинической практике. Последнее становится возможным вследствие целого ряда преимуществ ПФК-моделирования на

основе NLMEM и алгоритма SAEM. Эти преимущества включают возможность изучения ФК на ненормированных выборках и при разреженных данных, отсутствие необходимости проводить ФК-заборы в строгие временные интервалы, отсутствие необходимости наличия полных ФК-профилей; упрощение расчёта размера выборки⁶, достаточной для проверки

⁶ Задача расчёта объёма выборки для тестирования многомерных ковариационных зависимостей в областях ФК/ФД актуальна уже несколько десятилетий [37] и всегда была сложной и трудно выполнимой на практике. При планировании исследований с NLMEM с применением SAEM оценка размера выборки может быть сведена к более простым процедурам, разработанным как для непрерывных, так и категориальных переменных [38–42].

возможной корреляции «параметр ФК–фактор». При таком дизайне практически нивелируется сложность и стоимость исследований, что подчёркивает практическую ценность популяционного ФК-моделирования и важность его внедрения в рутинную клиническую практику.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Платова Ангелина Игоревна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: platova@psychiatry.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9682-4623>

SPIN-код: 6656-2194

м. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Platova Angelina I.

Corresponding author

e-mail: platova@psychiatry.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9682-4623>

SPIN code: 6656-2194

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

Список литературы / References

1. Guideline on reporting the results of population pharmacokinetic analyses. Doc. Ref. CHMP/EWP/185990/06. 21 June, 2007. Electronic resource. European Medicines Agency Official website. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003067.pdf (accessed: 13.12.2020).

2. Owen JS, Fiedler-Kelly J. Introduction to population pharmacokinetic / pharmacodynamic analysis with nonlinear mixed effects models. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2014. 301 p.

3. Lavielle M, Mentre F. Estimation of population pharmacokinetic parameters of saquinavir in HIV patients with the MONOLIX software. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2007;34(2):229–249. DOI: 10.1007/s10928-006-9043-z.

4. Дедов И.И., Тюльпаков А.Н., Чехонин В. П., Баклаушев В.П., Арчаков А.И., Мошковский С.А. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы. *Вестник РАМН.* 2012;(12):4–12. [Dedov II, Tyul'pakov AN, Chekhonin VP, Baklaushev VP, Archakov AI, Moshkovskii SA. Personalized medicine: State-of-the-art and prospects. *Vestnik RAMN.* 2012;(12):4–12. (In Russ).].

5. Sheiner LB. The population approach to pharmacokinetic data analysis: rationale and standard data analysis methods. *Drug Metab Rev.* 1984; 15(1-2):153–171. DOI: 10.3109/03602538409015063.

6. Guidance for Industry. Population Pharmacokinetics. FDA. CDER. CBER. February, 1999. Electronic resource. US. Food and Drug Administration (FDA). Official website. URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM072137.pdf> (accessed: 13.12.2020).

7. Терапевтический лекарственный мониторинг: инструмент персонализированной медицины (методические рекомендации) / под ред. акад. РАМН В.Г. Кукеса (Россия) и проф. Д. Берри (Великобритания). М.: Изд-во Автономной некоммерческой организации «Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов»; 2013: 48 с. [Terapevticheskij lekarstvennyj monitoring: instrument personalizirovannoj mediciny (metodicheskie rekomendacii) / Pod red. akad.

RAMN V. G. Kukesa (Rossiya) i prof. D. Berri (Velikobritaniya). Moscow: Izd-vo Avtonomnoj nekommercheskoj organizacii «Mezhdunarodnaya associaciya klinicheskikh farmakologov i farmaceutov»; 2013. (In Russ).].

8. Long-Boyle JR, Savic R, Yan S, et al. Population pharmacokinetics of busulfan in pediatric and young adult patients undergoing hematopoietic cell transplant: a model-based dosing algorithm for personalized therapy and implementation into routine clinical use. *Ther Drug Monit.* 2015;37(2):236–245. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000131.

9. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика. М.: Медицина; 1980. 494 с. [Solov'ev VN, Firsov AA, Filov VA. Farmakokinetika. Moscow: Medicina; 1980. (In Russ).].

10. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика. Ростов-на-Дону: Феникс; 2001. 384 с. [Karkishchenko NN, Horon'ko VV, Sergeeva SA, Karkishchenko VN. Farmakokinetika. Rostov-na-Donu: Feniks. 2001. (In Russ).].

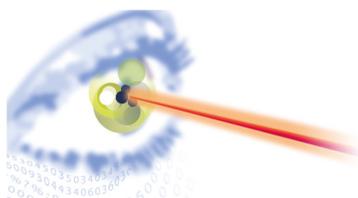
11. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная Фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. М.: Издательство РАМН; 2003. 208 с. [Sergienko VI, Dzhelliff R, Bondareva IB. Prikladnaya Farmakokinetika: osnovnye polozheniya i klinicheskoe primeneniye. Moscow: Izdatel'stvo RAMN; 2003. (In Russ).].

12. Мирошниченко И.И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. М.: ООО Издательство Медицинское информационное агентство; 2011: 353–371. [Miroshnichenko II. Racional'noe dozirovanie i monitoring lekarstvennyh sredstv. Moscow: OOO Izdatel'stvo Medicinskoe informacionnoe agentstvo; 2011. 353–371. (In Russ).].

13. Heeremans EH, Proost JH, Eleveld DJ, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics in anesthesia, intensive care and pain medicine. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2010;23(4):479–484. DOI: 10.1097/ACO.0b013e32833a1d2f.

14. Watanabe-Uchida M, Watanabe T, Narukawa M. The Current State and Future Prospects of Population Pharmacokinetic Research in Post-marketing Clinical Studies in Japan. *Yakugaku Zasshi.* 2019;139(10):1297–1303. DOI: 10.1248/yakushi.18-00227.

15. Beal SL, Sheiner LB. NONMEM users guides In EDS. Text data. San Francisco: NONMEM Project Group. University of California, CA; 1992 (CD-ROM).
16. Холодов Л.Е., Яковлев В.П. Клиническая фармакокинетика. М.: Медицина; 1985. 464 с. [Holodov LE, Yakovlev VP. Klinicheskaya farmakokinetika. Moscow: Medicina; 1985. (In Russ).].
17. Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, Morris ME. Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos.* 2008;29(4):205–217. DOI: 10.1002/bdd.605.
18. Vonesh EF, Carter RL. Mixed-effects nonlinear regression for unbalanced repeated measures. *Biometrics.* 1992;48(1):1–17.
19. Bauer RJ, Guzy S, Chee Ng. A survey of population analysis methods and software for complex pharmacokinetic and pharmacodynamic models with examples. *AAPS J.* 2007;9(1): E60–E83. DOI: 10.1208/aapsj0901007.
20. Joerger M. Covariate pharmacokinetic model building in oncology and its potential clinical relevance. *AAPS J.* 2012;14(1):119–132. DOI: 10.1208/s12248-012-9320-2.
21. Горьков В.А., Карамышева Е.И. Введение в фармакокинетику. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2004;(1):2–4. [Gor'kov VA, Karamysheva EI. Vvedenie v farmakokinetiku. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2004;(1):2–4. (In Russ).].
22. WinNonlin® User's Guide in EDS.: Pharsight Corporation. University of California, 800 West El Camino Real, Suite 200, Mountain View, California 94040, 2009. (CD- ROM).
23. Gibaldi M, Perrier D. Pharmacokinetics. New York: Marcell Decker; 1982.
24. Gabrielsson J, Weiner D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press; 2000 (third edition), 925 p.
25. Rosenbaum S. Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics: an integrated textbook and computer simulations. New Jersey: J. Wiley & Sons; 2011, 430 p.
26. Davda JP, Dodds MG, Gibbs MA, Wisdom W, Gibbs J. A model-based meta-analysis of monoclonal antibody pharmacokinetics to guide optimal first-in-human study design. *Mabs.* 2014;6(4):1094–1102. DOI: 10.4161/mabs.29095.
27. Bonate PL, Howard DR. Compartmental models in pharmacokinetics in drug development: clinical study design and analysis. *AAPS.* 2004;1:291–362.
28. Clifford AJ, Müller H-G. Mathematical modeling in experimental nutrition. New York: Plenum Press; 1998, 426 p.
29. Frommer A, Szyld DB. H-Splittings and two-stage iterative methods. *Numerische Mathematik.* 1992;63(1):345–356.
30. Tatarinova T, Neely M, Bartroff J, et al. Two general methods for population pharmacokinetic modeling: non-parametric adaptive grid and non-parametric Bayesian. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2013;40(2):189–199. DOI: 10.1007/s10928-013-9302-8.
31. Jelliffe RW, Schumitzky A. Modeling, adaptive control, and optimal drug therapy. *Med Prog Technol.* 1990;16(1-2):95–110.
32. Savic RM, Mentré F, Lavielle M. Implementation and evaluation of the SAEM algorithm for longitudinal ordered categorical data with an illustration in pharmacokinetics – pharmacodynamics. *AAPS J.* 2011;13(1):44–53. DOI: 10.1208/s12248-010-9238-5.
33. Urien C, Bardin C, Bader-Meunier B et al. Anakinra pharmacokinetics in children and adolescents with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis and autoinflammatory syndromes. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2013;14:40. doi: 10.1186/2050-6511-14-40.
34. Karlsson MO, Beal SL, Sheiner LB. Three new residual error models for population PK/PD analyses. *J Pharmacokinetics Biopharm.* 1995;23(6):651–672. DOI: 10.1007/BF02353466.
35. Mould DR, Upton RN. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development-part 2: introduction to pharmacokinetic modeling methods. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2013;2(4):e38. DOI: 10.1038/psp.2013.14.
36. Мирошниченко И.И., Платова А.И. Проблемы персонализации психофармакотерапии. *Психиатрия.* 2015;(3):85–94. [Miroshnichenko II, Platova AI. Personalized psychopharmacotherapy: State of problem. *Psikhiatriya.* 2015;(3):85–94. (In Russ).].
37. Gatsonis C, Sampson AR. Multiple correlation: exact power and sample size calculations. *Psychol Bull.* 1989;106(3):516–524. DOI: 10.1037/0033-2909.106.3.516.
38. Kang D, Schwartz JB, Verotta D. Sample size computation method for non-linear mixed effects models with applications to pharmacokinetics models. *Stat Med.* 2004;23(16): 2551–2566. DOI: 10.1002/sim.1695.
39. Samson A, Lavielle M, Mentré F. The SAEM algorithm for group comparison tests in longitudinal data analysis based on non-linear mixed-effects model. *Stat Med.* 2007;26(27):4860–4875. DOI: 10.1002/sim.2950.
40. Retout S, Comets E, Samson A, Mentré F. Design in nonlinear mixed effects models: optimization using the Fedorov–Wynn algorithm and power of the Wald test for binary covariates. *Stat Med.* 2007;26(28):5162–5179. DOI: 10.1002/sim.2910.
41. Bertrand J, Comets E, Laffont CM, Chenel M, Mentré F. Pharmacogenetics and population pharmacokinetics: impact of the design on three tests using the SAEM algorithm. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2009;36(4):317–339. DOI: 10.1007/s10928-009-9124-x.
42. Combes FP, Retout S, Frey N, Mentré F. Powers of the likelihood ratio test and the correlation test using empirical bayes estimates for various shrinkages in population pharmacokinetics. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2014;3(4):e109. DOI: 10.1038/psp.2014.5.



**Издательство
ОКИ**

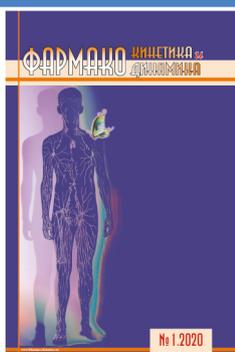
ООО «Издательство ОКИ» выпускает 4 периодических научных специализированных медико-фармацевтических журналов, предназначенных для врачей, провизоров, фармацевтов, специалистов НИИ, преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов, организаторов здравоохранения, клинических исследователей, 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

Тел.: +7 (910) 449-22-73 - e-mail: clinvest@mail.ru