

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

ФАРМАКО КИНЕТИКА и ДИНАМИКА

Включен в перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ



№2.2023



Издательство
ОКИ

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

Коллик 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

Мирошниченко Игорь Иванович
д. м. н., Москва

Рудакова Алла Всеволодовна
д. фарм. н., профессор,
Санкт-Петербург

Раменская Галина Владиславовна
д. фарм. н., профессор, Москва

Сариев Абрек Куангалиевич
д. м. н., профессор, Москва

Спасов Александр Алексеевич
академик РАН, д. м. н.,
профессор, Волгоград

Стародубцев Алексей Константинович
д. м. н., профессор, Москва

Сычёв Дмитрий Алексеевич
академик РАН, д. м. н.,
профессор, Москва

Тюренков Иван Николаевич
член-корр. РАН, д. м. н.,
профессор, Волгоград

Хохлов Александр Леонидович
академик РАН, д. м. н.,
профессор, Ярославль

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 30.06.2023 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. ISSN 2587-7836. Журнал включен в перечень ВАК. 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.MyRWD.ru
www.Patient-Oriented.ru
www.PharmacoGenetics-Pharmaco-Genomics.ru

Журналы
Антибиотики и Химиотерапия
Качественная клиническая практика
Реальная клиническая практика: данные и доказательства
Пациентоориентированная медицина и фармация
Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru
www.izdat-Oki

Центр Фармакоэкономических Исследований
Издательство ОКИ

АКТУАЛЬНЫЕ ОБЗОРЫ

Кардиопротекторные средства с биароматической структурой.
Часть 5. Блокаторы калиевых каналов Kv1.5
Мокров Г. В. 3

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Комбинированное воздействие фабомотизола и соединения
АЛМ-802 на деполяризацию предсердий в условиях
трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии
у крыс
Смирнова С. Л., Рощевская И. М., Барчуков В. В., Цорин И. Б.,
Крыжановский С. А. 14

Исследование антиаритмической активности линейных
алкоксифенилазаалканов на модели реперфузионных
аритмий у крыс
Барчуков В. В., Столярук В. Н., Цорин И. Б., Вититнова М. Б.,
Крыжановский С. А., Воробьева Т. Ю., Бирюкова В. Е.,
Мокров Г. В. 20

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Изучение базовых фармакокинетических свойств
нового производного гистидин-содержащего
дипептида карнозина — пирролилкарнозина
Абаимов Д. А., Хуторова А. В., Сариев А. К., Куликова О. И.,
Белоусова М. А., Стволинский С. Л., Мизгулин В. А.,
Фёдорова Т. Н. 29

Изучение влияния приёма пищи на биодоступность,
безопасность и переносимость лекарственного препарата
Атериксен®, таблетки, 100 мг у здоровых добровольцев
Василюк В. Б., Джурко Ю. А., Глобенко А. А., Шитов Л. Н.,
Шабров В. Н., Пасько М. А., Ковчан О. В., Капашин А. В.,
Башкатова А. И. 37

МЕТОДЫ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оценка перспективы использования модели гестационного
сахарного диабета для поиска средств фармакологической
коррекции нарушений у потомства крыс
Соломина А. С., Родина А. В., Качалов К. С., Захаров А. Д.,
Дурнев А. Д. 45

Сочетание высокоуглеводной диеты и стрептозотоцина
для моделирования сахарного диабета 2 типа
у крыс Вистар
Иванов С. В., Островская Р. У. 54

МЕТОДЫ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Методика количественного анализа маркерного
субстрата ABCB1-белка фексофенадина
в лизате клеток Caco-2
Копаница М. А., Транова Ю. С., Черных И. В., Шулькин А. В.,
Мыльников П. Ю., Калинкина О. В., Якушева Е. Н. 60



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

Kolyanov Gennady

Ph.D., Moscow

Mirzoyan Ruben

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

Miroshnichenko Igor

Ph.D., Moscow

Rudakova Alla

Ph.D., Professor, St. Petersburg

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Moscow

Starodubtcev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

Academician RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Tyurenkov Ivan

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

Khokhlov Alexander

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Yaroslavl

ISSUING GROUP

Belousov Dmitry

Managing Editor
+ 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-okl.ru

Zhuk Elena

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

Signed in print 30.06.2023 г. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com
115093, Moscow, Partiyinyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. 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.Pharmacokinetica.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. ISSN 2587-7836. **The journal is included in the list of Higher Attestation Commission (HAC) of Russian Federation.** 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.MyRWD.ru
www.Patient-Oriented.ru
www.Pharmacogenetics-Pharmacogenomics.ru

Journals

Antibiotics and Chemotherapy
Good Clinical Practice
Real-World Data & Evidence
Patient-Oriented Medicine and Pharmacy
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru
www.izdat-OkI.ru

Center of Pharmacoeconomics Research
Publisher OKI

REVIEW

Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 5.
Potassium Kv1.5-channels blockers

Mokrov GV 3

PRECLINICAL PHARMACODYNAMIC STUDIES

Combined effect of fabomotizol and the compound ALM-802
on atrial depolarization in a translational model of alcoholic
cardiomyopathy in rats

*Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Barchukov VV, Tsorin IB,
Kryzhanovskii SA* 14

Study of the antiarrhythmic activity of linear
alkoxyphenylazalkanes in the model of reperfusion
arrhythmias in rats

*Barchukov VV, Stolyaruk VN, Tsorin IB, Vititnova MB,
Kryzhanovsky SA, Vorobieva TYu, Biryukova VE,
Mokrov GV* 20

PRECLINICAL AND CLINICAL PHARMACOKINETICS

The pilot study of the basic pharmacokinetic properties of
pyrrolylcarnosine — the new pyrrolic derivative of dipeptide
carnosine

*Abaimov DA, Khutorova AV, Sariev AK, Kulikova OI,
Belousova MA, Stvolinsky SL, Migulin VA, Fedorova TN* 29

Study of the effect of food on the bioavailability, safety
and tolerability of Aterixen® 100 mg tablet
in healthy volunteers

*Vasilyuk VB, Dzhurko YuA, Globenko AA, Shitov LN,
Shabrov VN, Pasko MA, Kovchan OV, Kapashin AV,
Bashkatova AI* 37

METHODS OF PHARMACODYNAMIC STUDIES

Evaluating the prospects of using gestational diabetes
mellitus model to find means of pharmacological correction
of the disorders in rat offspring

*Solomina AS, Rodina AV, Kachalov KS, Zaharov AD,
Durnev AD* 45

Combination of a high-carbohydrate diet and streptozotoc
in for modeling type 2 diabetes in Wistar rats

Ivanov SV, Ostrovskaya RU 54

METHODS OF PHARMACOKINETIC STUDIES

Method for quantitative analysis of the marker substrate
ABCB1-protein fexofenadine in Caco-2 cell lysate

*Kopanitsa MA, Tranova YuS, Chernykh IV, Shchulkin AV,
Mylnikov PYu, Kalinkina OV, Yakusheva EN* 60

Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 5. Блокаторы калиевых каналов Kv1.5

© Мокров Г. В.

ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Калиевый канал Kv1.5 обеспечивает сверхбыстрый ток замедленного выпрямления I_{Kur} , который действует избирательно в клетках предсердий человека. Благодаря этому избирательная блокада Kv1.5 является перспективным подходом к контролю предсердных аритмий без неблагоприятных желудочковых эффектов, характерных для классических блокаторов калиевых каналов hERG-подтипа (Kv11.1). В настоящем обзоре рассмотрены все известные на сегодняшний день блокаторы Kv1.5-канала с биароматической структурой и данные об их биологических свойствах. Для многих исследованных Kv1.5-селективных соединений подтверждена способность препятствовать развитию предсердных аритмий без влияния на желудочковую рефрактерность.

Ключевые слова: антиаритмики; кардиопротекторы; блокаторы Kv1.5-каналов; биароматические соединения

Для цитирования:

Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 5. Блокаторы калиевых каналов Kv1.5. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(2):3–13. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-3-13>

Поступила: 27 апреля 2023 г. **Принята:** 30 апреля 2023 г. **Опубликована:** 30 июня 2023 г.

Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 5. Potassium Kv1.5-channels blockers

© Grigory V. Mokrov

FSBI "Research Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. The Kv1.5 potassium channel provides an ultra-rapid delayed rectifier potassium current, I_{Kur} that acts selectively in human atrial cells. This makes selective Kv1.5 blockade a promising approach to control atrial arrhythmias without the adverse ventricular effects associated with classical hERG-subtype potassium channel blockers (Kv11.1). This review considers all currently known Kv1.5-channel blockers with a biaromatic structure and data on their biological properties. For many of the Kv1.5-selective compounds studied, the ability to prevent the development of atrial arrhythmias without affecting ventricular refractoriness was confirmed.

Keywords: antiarrhythmics; cardioprotectors; Kv1.5 channel blockers; biaromatic compounds

For citations:

Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 5. Potassium Kv1.5-channels blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(2):3–13. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-3-13>

Received: April 27, 2023. **Accepted:** April 30, 2023. **Published:** June 30, 2023.

Список сокращений / List of abbreviations

Cav1.2	—	Потенциал-зависимый кальциевый канал, изоформа 1.2
HCN	—	Циклически-нуклеотид-управляемый канал, активируемый гиперполяризацией
hERG	—	Канал, кодируемый геном «human ether-a-go-go-related gene»
IC_{50}	—	Полумаксимальная ингибирующая концентрация
$I_{Ca,L}$	—	Кальциевый ток L-типа
I_{K1}	—	Калиевый ток аномального выпрямления
I_{Kr}	—	Быстрый калиевый ток задержанного выпрямления
I_{Ks}	—	Медленный калиевый ток задержанного выпрямления
I_{Kur}	—	Сверхбыстрый калиевый ток задержанного выпрямления
I_{Na}	—	Натриевый ток
FLIPR	—	Технология флуоресцентного анализа ионных каналов
Kvx.y	—	Потенциал-зависимый калиевый канал; изоформа x.y

Введение / Introduction

Трепетание предсердий и мерцательная аритмия являются наиболее распространёнными сердечными аритмиями. Они являются частой причиной развития сердечной недостаточности и инфарктов [1–3]. К фибрилляции предсердий приводит неравномерное

распространение сердечного импульса. Один из подходов к предотвращению фибрилляции заключается в повышении рефрактерности миокарда путём блокады реполяризирующих токов, проводимых по каналам ионов калия (K^+). Большинство используемых в настоящее время в клинической практике антиаритмических средств блокируют канал hERG и связанный с ним

реполярирующий ток I_{Kr} , который присутствует как в предсердиях, так и в желудочках. В то время как блокада hERG в предсердиях может снизить предсердные аритмии, блокада hERG в желудочках приводит к удлинению интервала QT и повышенной склонности к опасным для жизни желудочковым аритмиям. Блокада предсердно-селективных K^+ -каналов может обеспечить эффективный подход к контролю предсердных аритмий, лишённый неблагоприятных желудочковых эффектов. Одним из таких предсердно-селективных каналов является Kv1.5, который обеспечивает сверхбыстрый ток замедленного выпрямления I_{Kur} [4–6]. Ток I_{Kur} действует избирательно в клетках предсердий человека, поэтому Kv1.5 является перспективной и многообещающей биомишенью для разработки безопасных и эффективных лекарств для профилактики предсердных аритмий [7].

Настоящий обзор посвящён рассмотрению существующих в литературе блокаторов каналов Kv1.5 в ряду биароматических соединений с линейным линкером (БСЛ). Он является продолжением серии работ по анализу каридопротекторных свойств в группе биароматических соединений. Ранее были рассмотрены блокаторы кальциевых каналов [8], HCN-каналов [9], натриевых каналов [10] и блокаторов/модуляторов hERG-каналов [11].

Орто-дизамещённые бис-арильные соединения / Ortho-disubstituted bis-aryl compounds

В начале 2000-х годов исследователи из Aventis Pharma Deutschland GmbH запатентовали группу орто-дизамещённых бисарильных соединений **1** с блокирующей активностью в отношении каналов Kv1.5 (рис. 1). Эти

соединения имеют два ароматических ядра, связанных комплексным линкером. В центральной части линкера два фенильных кольца связаны друг с другом. Линкер также содержит амидную группу и 1–3 гетероатома.

Наиболее активные соединения (AVE-0118, A1899 и S9947) ингибировали канал Kv1.5 в микромолярных концентрациях (IC_{50} 5,4, 2,7 и 0,7 мкМ, соответственно), проявляли хорошую селективность в отношении канала Kv1.3 и не оказывали существенного влияния на канал hERG и натриевые токи. Соединения AVE-0118, A1899 и S9947 показали высокую эффективность в модели аритмии у свиней. Ароматические фармакофоры перечисленных соединений представляют собой *n*-метоксифенильные группы, пиридиновые группы, дифторфенильные или свободные фенильные группы [12].

Исследования на животных продемонстрировали способность AVE0118 пролонгировать предсердный эффективный рефрактерный период (ЭРП) и кардиовертнуть фибрилляцию предсердий (ФП) с небольшим влиянием на желудочковую рефрактерность и интервал QT на модели у коз. Восстановление синусового ритма с помощью AVE0118 сопровождалось улучшением сократительной способности предсердий, в то время как традиционные препараты с положительным инотропным действием (добутамин, дигоксин) и кальциевые сенсibilизаторы не влияли на функцию предсердий после кардиоверсии. Наибольшее влияние на предсердную рефрактерность, по-видимому, ограничивалось левым предсердием и было менее выраженным в правом предсердии. В нормальных предсердиях коз как AVE0118, так и дофетилид продемонстрировали чёткую зависимость их эффектов от скорости рефрактерности предсердий, однако в

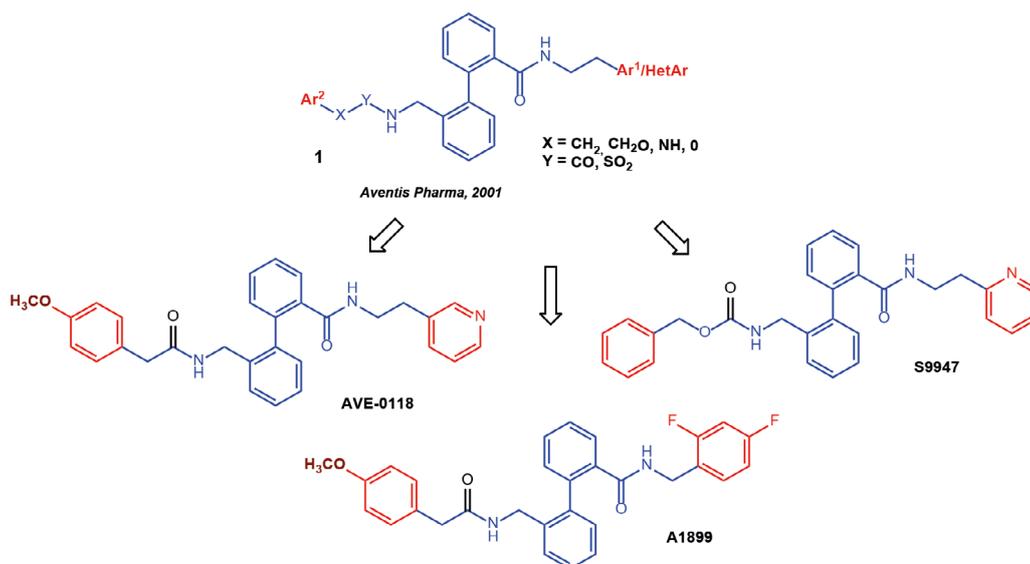


Рис. 1. Разработка блокаторов Kv1.5 среди орто-дизамещённых бис-арильных соединений
Fig. 1. Development of Kv1.5 blockers among ortho-disubstituted bis-aryl compounds

ремоделированных предсердиях после 48 часов непрерывной ФП AVE0118 удлинял ЭРП до уровня до ремоделирования и предотвращал индукцию ФП в двух третях экспериментов, в то время как дофетилид терял своё влияние на рефрактерность и уязвимость предсердий. О клинических исследованиях AVE0118 не сообщалось, и его разработка, вероятно, была прекращена [13].

Блокаторы Kv1.5 с центральным 5-членным гетероциклом / Kv1.5 blockers among with central 5-membered heterocycle

В 2002 г. исследователи из Icagen Inc. и Eli Lilly and Company (США) запатентовали производные тиазолидинона **2** в качестве блокаторов Kv1.5 (рис. 2). Соединения ингибировали отток ^{86}Rb через калиевые каналы Kv1.5, экспрессируемые в клетках СНО. Эти результаты также были подтверждены с использованием метода пэтч-кламп. Среди наиболее активных соединений этой группы были US6395730-cpd5 (IC₅₀ 6 мкМ) и US6395730-cpd52 (IC₅₀ 0,2 мкМ). В этих со-

единениях с коротким линкером длиной в 5 связей в качестве первых ароматических групп использовался *n*-метоксифенил; а в качестве вторых – диметил- или диметоксифенил [14].

Jackson CM с соавт. из компании Procter and Gamble Pharmaceuticals (США) продолжили это исследование, синтезировав ряд соединений **3**, характеризующихся наличием дополнительного заместителя в тиазолидиноновом кольце. Среди этих соединений **Jackson-4d**, прямой аналог US6395730-cpd52 с дополнительной метильной группой, был наиболее эффективным блокатором Kv1.5 со значением IC₅₀ 69 нМ [15].

В 2006 г. та же исследовательская группа представила близкие производные тетразола **4** в качестве блокаторов Kv1.5. Соединения новой группы имели сходную структуру фармакофора, но в качестве центрального гетероциклического фрагмента использовалось тетразольное кольцо. Новые соединения имели IC₅₀ в диапазоне от 180 до 550 нМ, среди которых лидером был **Wu-2j** со значением IC₅₀ 180 нМ (метод пэтч-кламп, клетки HEK-298). Исследования *in vivo*

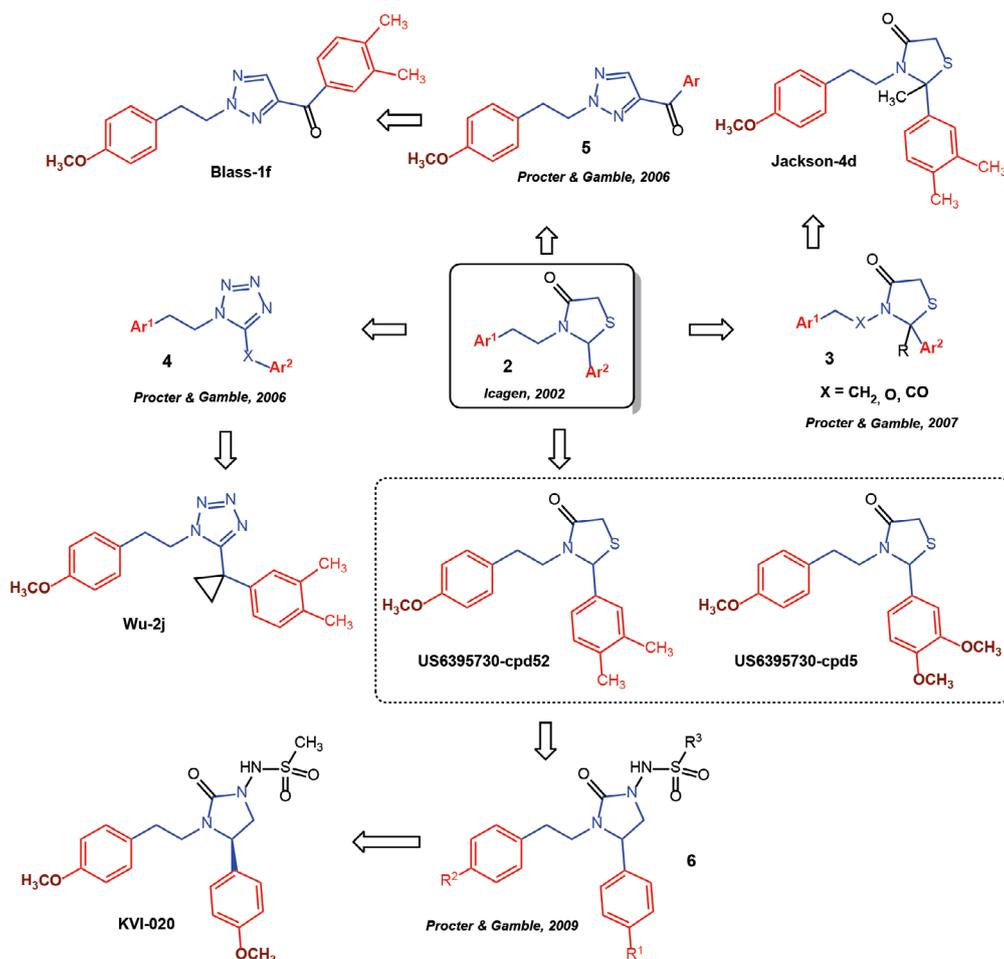


Рис. 2. Разработка блокаторов Kv1.5 с центральным 5-членным гетероциклом
 Fig. 2. Development of Kv1.5 blockers among with central 5-membered heterocycle

показали, что соединение Wu-2j увеличивает ЭРП правого предсердия примерно на 40 %, не влияя на ЭРП желудочка (у анестезированных минипигов). В структуре этого соединения были сохранены ароматические фармакофоры молекулы Jackson-4d. Также в линкере длиной в 6 связей присутствовало циклопропановое кольцо [16].

Сходная группа **5** была получена на основе триазольного гетероцикла в другой работе тех же авторов. Первоначальный скрининг этого класса соединений с помощью пЭтч-кламп в клетках ЛТК, экспрессирующих канал Kv1.5, показал, что важным является наличие заместителя в 4-м положении ацетофенонового фрагмента. Соединение **Blass-1f** из этой группы с теми же ароматическими фармакофорами, что и в Jackson-4d, было отобрано для дальнейшего развития на основании его селективности в отношении Kv1.5 ($IC_{50} = 294$ нМ) по сравнению с другими каналами ($IC_{50}(hERG) > 50$ мкМ, $IC_{50}(Kv1.3) = 10,1$ мкМ, $IC_{50}(Cav1.2) = 26$ мкМ). Эффективность *in vivo* была продемонстрирована после 15-минутной инфузии Blass-1f в дозе 30 мг/кг анестезированным свиньям. При этом наблюдалось увеличение предсердного ЭРП на 12 %, в то время как желудочковый ЭРП оставался неизменным [17].

В 2009 г. была разработана группа сульфониламинозамещённых имидазолидинонов **6** в качестве эффективных блокаторов Kv1.5. Она была предложена на основе соединений из патента Icagen 2002 г. с сохранением относительного расположения арильных колец соединений **2** при замене метаболически лабильного 1,3-тиазолидинового кольца на более стабильную имидазолидиноновую систему. Соединения **6** оценивали на активность в отношении Kv1.5 с использованием автоматизированной пЭтч-кламп системы и клонированных каналов Kv1.5 человека, экспрессированных в клетках CHO, с последующей оценкой активности в отношении hERG. Соединение **KVI-020** с идентичными *n*-метоксифенилароматическими группами было выбрано для дальнейшего исследования в качестве лидера. Оно имело высокую аффинность к Kv1.5 ($IC_{50} = 480$ нМ), селективность в отношении hERG (31-кратная) и имело удовлетворительные фармацевтические свойства. Соединение **KVI-020** также было селективным в отношении каналов Nav1.5, Cav1.2 и Cav1.3, но было менее селективным в отношении гомологичных каналов Kv1.1, Kv1.3 и Kv4.3.

Далее эффективность **KVI-020** оценивали *in vivo* в нескольких животных моделях. В модели у собак при концентрациях KVI-020 в плазме 4,6 и 23 мкМ (1,9 и 6,3 мг/кг, в/в инфузия) наблюдалось увеличение предсердного ЭРП на 12 % и 17 %, соответственно, с сохранением желудочкового ЭРП неизменным, что согласуется с желаемой избирательностью предсердий. Прочие функции сердца, включая ЧСС (частота сердечных сокращений), АД (артериальное давление) и dp/dt , статистически не отличались между группами

лечения и контрольной группой, получавшей плацебо. В модели ФП у собак после перорального введения KVI-020 на 63 % снижал вероятность индукции ФП, на 55 % уменьшал среднюю продолжительность ФП, а общее время ФП уменьшалось на 52 % [18].

Блокаторы Kv1.5 с фенильной группой и насыщенным циклом в линкере / Kv1.5 blockers with a phenyl group and a saturated cycle in the linker

В рамках программы по созданию селективных ингибиторов Kv1.5 в качестве потенциальных предсердно-селективных агентов для лечения ФП, *Gross MF с соавт.* из компании Icagen Inc. (США) и научно-исследовательского фармацевтического института Bristol-Myers Squibb (США) предложили производные арилсульфонамидоиндана **7** (рис. 3). В качестве ароматических фармакофоров в этой серии использовались *m*-метоксифенильная и *n*-этилфенильная группы. В конформационно жёстком линкере в дополнение к сульфонамидной группе и индановому кольцу использовали амидную группу.

Соединения группы **7** тестировали на ингибирование калиевого тока в клетках ЛТК или мышечных фибробластов L929, экспрессирующих человеческий Kv1.5, с использованием пЭтч-кламп метода. В ряду исследованных модификаций бициклического каркаса индановый ряд сохранил самый высокий уровень ингибирующей активности в отношении Kv1.5. Наиболее перспективным оказалось соединение **Gross-1** с ОН-группой в индановом кольце. Хиральность **Gross-1** значительно влияла на блокаду канала Kv1.5: **Gross (1R,2R)-1 (Icagen-4)** был примерно в 25 раз более активным, чем **Gross-(1S,2S)-1**. Впоследствии было изучено ингибирующее действие соединения **Gross (1R,2R)-1** на другие ионные каналы, включая калиевый канал (hERG), потенциалзависимый натриевый канал сердца человека (hSCN5A) и кальциевые каналы в клетках гипофиза крысы (GH3). Было обнаружено, что соединение **Gross (1R,2R)-1** обладает по крайней мере 300-кратной селективностью в сравнении со всеми тремя этими ионными каналами [19].

Дальнейшая оптимизация вышеуказанного ряда привела к группе соединений **8**, содержащих тетралиновый каркас. Исследование сульфонамидного фрагмента показало предпочтение пара-алкильного замещения в фенильном кольце. Соединение **Gross-2b** с *n*-пропильной группой оказалось наиболее активным и селективным к hERG ($IC_{50}(Kv1.5) = 0,09$ мкМ) [20].

Другим направлением в разработке потенциальных блокаторов Kv1.5 было создание подобных бензопирансульфонамидов **9**. В этой группе было выявлено несколько соединений с высокой блокирующей активностью в отношении блока I_{Kur} и хорошей селективностью в отношении блокады hERG. Например, соединение **Lloyf-5f** ингибировало Kv1.5 с $IC_{50} = 77$ нМ (клетки фибробластов мышей L929, экспрессирующие

человеческий Kv1.5). Интересно отметить, что в этом соединении линкер был значительно удлинен за счёт введения дополнительного этиламинового мостика. Кроме того, в ароматическом кольце отсутствовала метоксигруппа [21].

Заменой бензопиранового бицикла пирано[2,3-*b*] пиридиновым ядром была получена группа **10** с аналогичными свойствами. В частности, соединение **Finlay-28** со свободной фенильной группой ингибировало Kv1.5 с $IC_{50} = 378$ нМ [22].

Блокаторы Kv1.5 с пиррольным кольцом / Kv1.5 blockers with pyrrole ring

В 2006 г. *Fluxe A с соавт.* из Procter and Gamble Pharmaceuticals (США) получили карбаматы тетрагидроиндолона **11** в качестве блокаторов Kv1.5 (рис. 4). Первым ароматическим кольцом в соединениях этой

группы является пиррольное кольцо, связанное с циклогексаном. Через иминокарбаматный линкер тетрагидроиндолонный фрагмент связан со второй ароматической группой, которая представляет собой свободную или 4-замещённую фенильную группу. Наиболее активным соединением в этой группе было производное N-метилдиэтилпиррола **Fluxe-29** со значением $IC_{50} = 21$ нМ. Кроме того, карбамат **Fluxe-29** также был селективным в отношении hERG (> 450) и кальциевого канала L-типа (> 450) [23].

Та же группа учёных в том же году получила сходную группу семикарбазонов тетрагидроиндолона **12**. По сравнению с предыдущей группой эти соединения отличаются заменой атома кислорода на азот в линейном линкере. Несколько соединений показали очень хорошую активность в отношении блокады Kv1.5 *in vitro*. Производное метилэтилпиррола **Wu-8i** показало хорошую селективность в отношении блокады Kv1.5 по сравнению с hERG и кальциевыми каналами L-типа

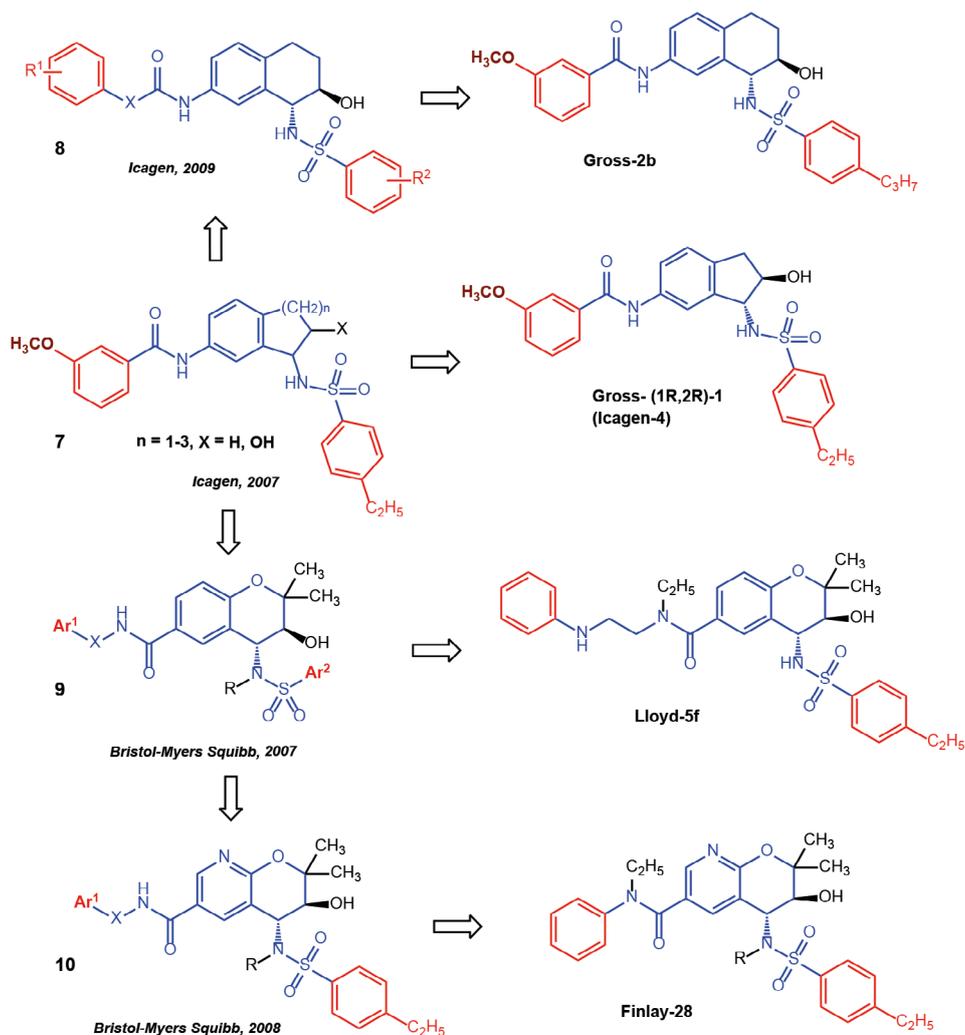


Рис. 3. Разработка блокаторов Kv1.5 в группе БСЛ с фенильным кольцом и насыщенным циклом в линкере
Fig. 3. Development of Kv1.5 blockers among LBC with phenyl and saturated cycle in the linker

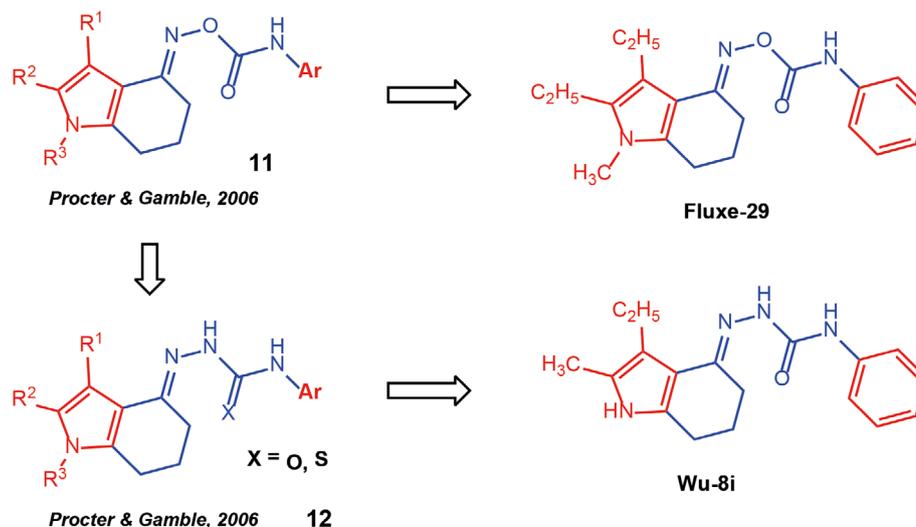


Рис. 4. Разработка блокаторов Kv1.5 с пиррольным кольцом
 Fig. 4. Development of Kv1.5 blockers with pyrrole ring

(IC_{50} 130 нМ против 21 мкМ и > 30 мкМ, соответственно). В модели у свиней соединение Wu-8i увеличивало предсердный ЭРП примерно на 28 % в правом предсердии, не влияя на желудочковый ЭРП [24].

Производные пиразолопиримидинов / Pyrazolopyrimidine derivatives

Основываясь на информации о том, что блокатор Cav1.2 нифедипин является слабым ингибитором Kv1.5, Vaccaro *W с соавт.* проанализировали набор соединений Bristol-Myers Squibb. (2008) на ингибирующую активность в отношении Kv1.5 с использованием метода фиксации напряжения (рис. 5). Соединения, которые ингибировали человеческий Kv1.5 в ооцитах *Xenopus*, далее оценивали на клетках млекопитающих (фибробласты мышей L929). В результате скрининга было выявлено соединение **hit-2** с умеренной активностью в отношении Kv1.5, но с высокой селективностью в отношении кальциевых каналов L-типа.

На основе этой структуры авторы получили группу биароматических соединений **13**, содержащих пиразолопиримидиновый бицикл в центральной части молекул. Более аффинными к Kv1.5 оказались соединения, содержащие два атома хлора в фенильном кольце, связанном с пиримидиновым кольцом, и атом фтора во второй фенильной группе. Наилучшие результаты показало соединение **Vaccaro-8b** со значением $IC_{50} = 70$ нМ (клетки L929). Соединение Vaccaro-8b также было более чем в 50 раз селективнее в отношении ионных каналов Kv1.5 по сравнению с ионными каналами hERG, I_{Na} , $I_{Ca,L}$, I_{Ks} и I_{Kl} [25].

Эта же группа авторов продолжила изучение производных пиразолопиримидина, получив в 2010 г. ряд

подобных соединений **14**, отличающихся наличием в линкере пирролидинового кольца вместо пиперазинового. Только два атома хлора использовались в качестве заместителей в фенильном кольце, связанном с пиримидиновым кольцом. Новые соединения тестировали на блокирование тока калия в клетках мышинных фибробластов L929, экспрессирующих человеческий Kv1.5. Как и в предыдущей работе, наиболее активным соединением оказалось *n*-фторфенилпроизводное BMS-394136 с $IC_{50} = 50$ нМ. Это соединение показало высокую селективность в отношении к hERG, натриевым и кальциевым каналам L-типа (> 10 мкМ).

Фармакодинамическую активность BMS-394136 исследовали в модели у кроликов, в которой измеряли ЭРП как в предсердии, так и в желудочке. Соединение пролонгировало ЭРП предсердий более чем на 20 % в дозе 3 мг/кг. Отражая селективность Kv1.5 по сравнению с желудочковыми ионными каналами, BMS-394136 не продемонстрировал влияния на желудочковый ЭРП вплоть до максимальной дозы 10 мг/кг при концентрации в плазме почти 7 мкМ [26].

Соединение BMS-394136 изучали в фазе I клинических испытаний для оценки предсердной селективности и безопасности у пациентов с имплантированными двухкамерными кардиостимуляторами или дефибрилляторами (2005–2008 гг., NCT00162448), однако результаты этого исследования не представлены.

Последующая оптимизация производных пиразолопиримидинов **14** путём варьирования как ароматических заместителей, так и групп в пиразолопиримидиновом ядре привела к соединениям **15**. В качестве соединения лидера было отобрано **Finlay-13j**, в котором в качестве ароматических групп использовались метиллиндол и метилоксазол. Введение трифторметильной

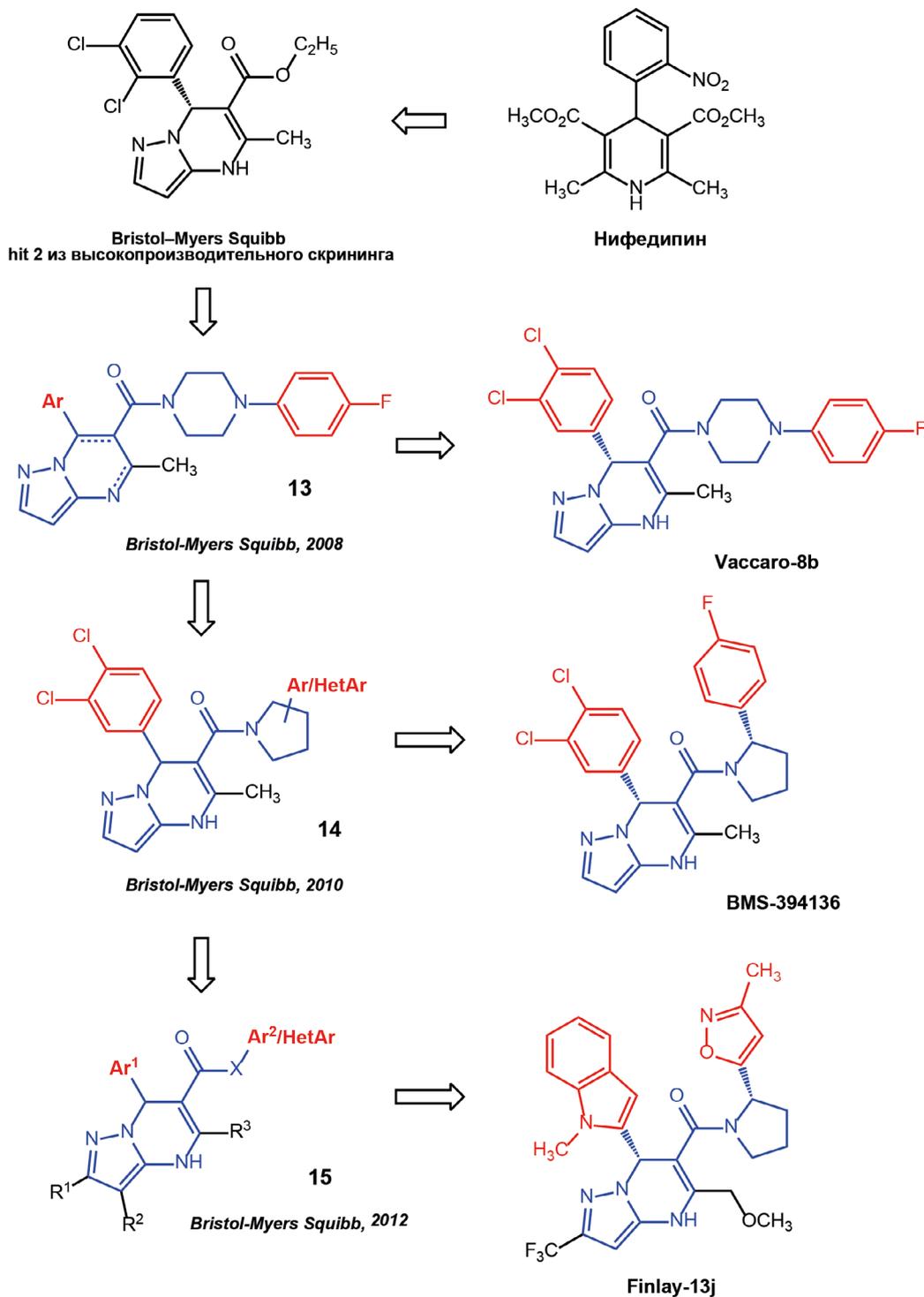


Рис. 5. Разработка блокаторов Kv1.5 с центральным пиразолопиримидиновым циклом
Fig. 5. Development of Kv1.5 blockers with central pyrazolopyrimidine bicyclic

группы в пиразольное кольцо позволило блокировать образование реакционноспособных интермедиатов, а наличие метоксиметильной группы в пиримидиновом кольце улучшило фармацевтический профиль молекулы. Соединение Finlay-13j блокировало Kv1.5 с $IC_{50} = 150 \text{ нМ}$, а также показало хорошую селективность по сравнению с другими ионными каналами сердца ($> 10 \text{ мкМ}$ для hERG, $I_{Ca,L}$, I_{Na}).

В модели у кроликов Finlay-13j в дозе 1 мг/кг соединение Finlay-13j увеличивало ЭРП предсердий на 20 % при концентрации в плазме 0,7 мкМ. Влияния препарата на желудочковую ЭРП выявлено не было, что отражает селективность Kv1.5 в отношении к желудочковым ионным каналам [27].

Блокаторы Kv1.5 от Pierre Fabre Medicament / Kv1.5 blockers from Pierre Fabre Medicament

В 2012 г. исследователи из компании Pierre Fabre Medicament (Франция) запатентовали группу гетероарилсульфонамидов **16** и **17**, обладающих свойствами ингибиторов Kv1.5 (рис. 6). Соединения этой группы имеют две гетероароматические группы (пиридиновую и бензотиазольную/бензооксазольную), связанные довольно длинным линкером из 10–11 связей, вклю-

чающим фенильную группу и пиперазин/пипиридиновое кольцо.

Фармакологическую оценку соединений на калиевом канале Kv1.5 проводили с использованием технологии FLIPR в клетках HEK293 путём измерения ионов таллия. Наибольший потенциал продемонстрировали соединения **WO 2012/069503 cpd2**, **WO 2012/069503-cpd3** и **WO 2012/069503-cpd27**, которые блокировали каналы Kv1.5 на 100 % при концентрации 10 мкМ. Эти соединения содержат один атом галогена в бензотиазольном кольце и незамещённый пиридиновый цикл [28].

Блокаторы Kv1.5 из Китайского фармацевтического университета / Kv1.5 Blockers from the Chinese Pharmaceutical University

Yang Q с соавт. из Китайского фармацевтического университета в 2009 г. предложили собственную фармакофорную модель ингибиторов каналов Kv1.5 с использованием алгоритма НуроGen, реализованного в пакете Catalyst 4.11 (рис. 7). Наиболее прогностическая гипотеза (Нуро1) полученная на основании 40 молекул обучающей выборки, состояла из одного ароматического кольца, двух гидрофобных точек и акцептора

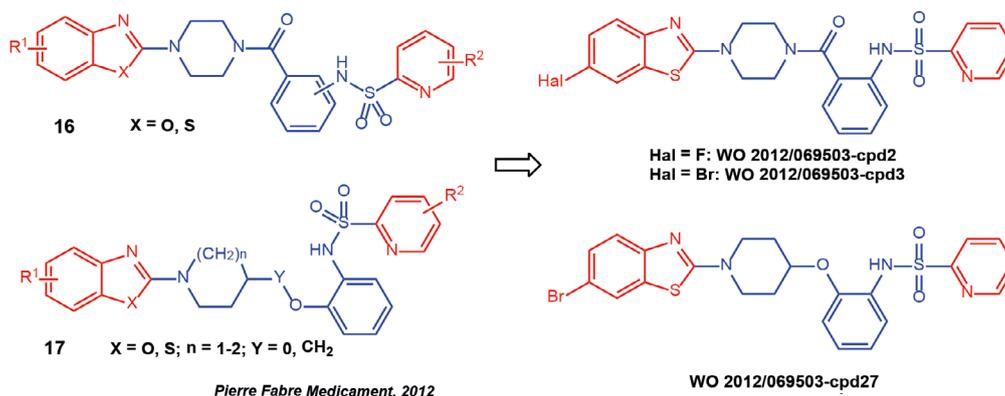


Рис. 6. Блокаторы Kv1.5 группы БСЛ компании Pierre Fabre Medicament
Fig. 6. Pierre Fabre Medicament LBC Kv1.5 blockers

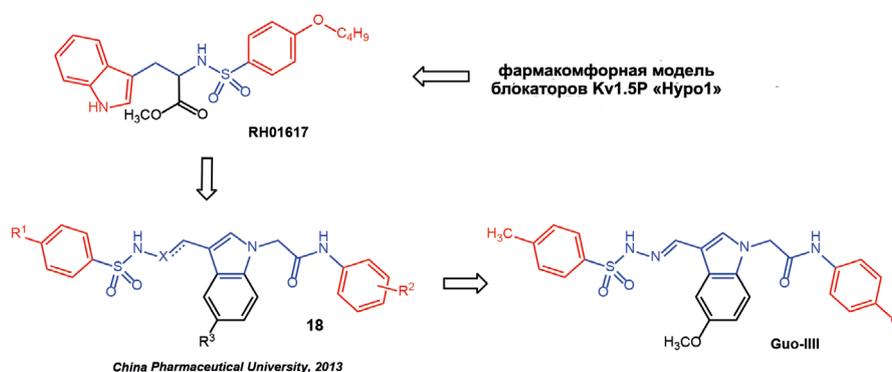


Рис. 7. Разработка Guo-III и его аналогов
Fig. 7. Development of Guo-III and analogues

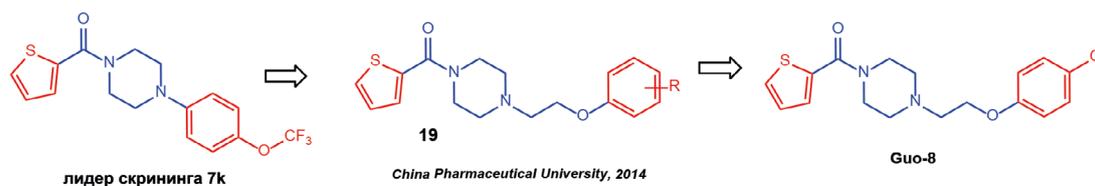


Рис. 8. Блокаторы Kv1.5 в ряду производных тиофена
Fig. 8. Kv1.5 blockers among thiophene derivatives

водородной связи [29, 30]. Используя эту модель, исследователи идентифицировали биароматическое соединение **RH01617** с умеренной ингибирующей активностью в отношении Kv1.5 (ингибирование 52 % при 10 мкМ, клетки HEK293). Ароматические группы в этом соединении включают индольное кольцо и бутоксифенильную группу. Линкер с 5 связями содержит сульфонамидную группу и боковую сложноэфирную группу.

Последующие структурные модификации этого соединения в соответствии с предложенной моделью фармакофора привели к ряду **18**, содержащему две монозамещенные фенильные группы в качестве арильных фармакофоров и индольное кольцо в центральной части линкера. При этом длина линкера была увеличена до 11 связей, а помимо сульфонамидной группы в его структуру были введены амидная группа и дополнительный атом азота.

Все соединения были проанализированы с использованием метода пэтч-кламп. Большинство из них обладало мощной ингибирующей активностью в отношении Kv1.5. Соединение **Guo-III** с метоксииндольным циклом в центральной части линкера с $IC_{50} = 0,51$ мкМ (клетки HEK 293) оценивали на селективность в отношении мишени, а также на фармакодинамические эффекты на модели у крыс. Guo-III показало хорошую селективность в отношении Kv1.5 по сравнению с калиевым каналом hERG и I_{Na} (> 800 и >100, соответственно). На изолированных сердцах крыс соединение Guo-III продемонстрировало дозозависимое пролонгирование предсердного ЭРП без увеличения желудочкового ЭРП [31].

Производные тиофена / Thiophene derivatives

Guo X с соавт. из Китайского фармацевтического университета в 2014 году с целью поиска новых ингибиторов калиевых каналов Kv1.5 провели скрининг внутренней базы соединений с использованием пэтч-клампа (клеточная линия HEK 293). В результате было идентифицировано соединение **7k** с тиофеновой и трифторметоксифенилароматической группами и пиперазинсодержащим линкером с умеренной ингибирующей активностью в отношении калиевых

каналов Kv1.5 человека (hKv1.5 $IC_{50} = 48$ мкМ) (рис. 8).

На основе структуры **7k** была сконструирована группа **19**, в которую была введена алкокси-цепь (OCH_2CH_2-) для повышения ингибирующей активности в отношении калиевого канала Kv1.5. В фенильное кольцо вводились различные заместители с различными электронными и стерическими свойствами для модуляции ингибирующей активности Kv1.5.

Результаты показали, что незамещенные по фенильному кольцу соединения проявляли пониженную активность по сравнению с соединениями со стерически объёмными заместителями. Биологическая активность для соединений с замещением в *para*-положении была выше, чем у соединений с замещением в *ortho*-положении. В этой серии наиболее активным соединением оказалось **Guo-8** с *n*-хлором в фенильном кольце ($IC_{50} = 0,72$ мкМ), которое продемонстрировало в 3 раза более высокую эффективность, чем дронедарон в положительном контроле ($IC_{50} = 2,37$ мкМ). Соединение Guo-8 предотвращало ФП, вызванную $CaCl_2$ -ACh *in vivo* у крыс линии SD, при этом эффект был близок к соталолу и превосходил активность дронедарона [32].

Заключение по блокаторам Kv1.5 / Conclusion on Kv1.5 blockers

Среди блокаторов Kv1.5, представленных в литературе, имеются БСЛ, существенно различающиеся по строению (рис. 9). В качестве внешних ароматических фармакофоров в этих соединениях использовались свободные или замещенные фенильные и гетарильные

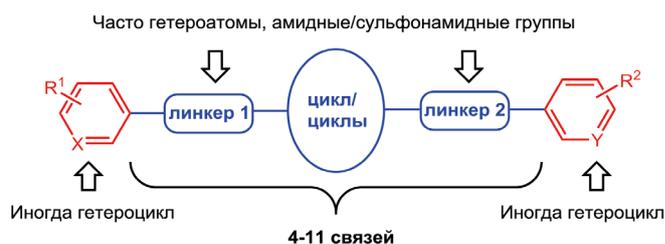


Рис. 9. Модель Kv1.5-блокаторов
Fig. 9. Kv1.5 blockers model

группы, а в качестве заместителей чаще использовались метоксигруппы, атомы галогенов или короткие алкильные группы. Структура линкера, связывающего ароматические фармакофоры, варьируется в широких пределах, его длина составляет от 4 до 11 связей. Лин-

кер обычно содержит один или даже два циклических/гетероциклических фрагмента, причём часто один из них является ненасыщенным. Во многих случаях линкер также содержит достаточно большое количество гетероатомов, амидных или сульфонамидных групп.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Мокров Григорий Владимирович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>

SPIN-код: 8755-7666

к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Grigory V. Mokrov

Corresponding author

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>

SPIN code: 8755-7666

PhD, Cand. Chemical Sci., Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *Am J Med.* 2002 Oct 1;113(5):359–64. DOI: 10.1016/s0002-9343(02)01236-6.
2. Vidaillet H, Granada JF, Chyou Po, et al. A population-based study of mortality among patients with atrial fibrillation or flutter. *Am J Med.* 2002 Oct 1;113(5):365–70. DOI: 10.1016/s0002-9343(02)01253-6.
3. Tsang TS, Gersh BJ. Atrial fibrillation: an old disease, a new epidemic. *Am J Med.* 2002 Oct 1;113(5):432–5. DOI: 10.1016/s0002-9343(02)01245-7.
4. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res.* 1993 Dec;73(6):1061–76. DOI: 10.1161/01.res.73.6.1061.
5. Feng J, Wible B, Li GR, et al. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res.* 1997 Apr;80(4):572–9. DOI: 10.1161/01.res.80.4.572.
6. Nattel S, Yue L, Wang Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem.* 1999;9(4-5):217–26. DOI: 10.1159/000016318.
7. Vos MA. Atrial-specific drugs: the way to treat atrial fibrillation? *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2004 Dec;15(12):1451–2. DOI: 10.1046/j.1540-8167.2004.04569.x.
8. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 1. Блокаторы кальциевых каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2021;(4):3–1. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 1. Calcium channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2021;(4):3–17. (In Russ).] DOI: 10.37489/2587-7836-2021-4-3-17.
9. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 2. Блокаторы HCN-каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(2):03–10. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 2. HCN channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(2):03–10. (In Russ).] DOI: 10.37489/2587-7836-2022-2-03-10.
10. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 3. Блокаторы натриевых каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(3):3–9. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 3. Sodium channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(3):3–9. (In Russ).] DOI: 10.37489/2587-7836-2022-3-3-9.

11. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 4. Блокаторы и модуляторы калиевых hERG-каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(4):3–19. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 4. Potassium hERG channels blockers and modulators. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(4):3–19. (In Russ).] DOI: 10.37489/2587-7836-2022-4-3-19.
12. Peukert S, Brendel J, Pirard B, et al. Identification, synthesis, and activity of novel blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *J Med Chem.* 2003 Feb 13;46(4):486–98. DOI: 10.1021/jm0210461.
13. Savelieva I, Camm J. Anti-arrhythmic drug therapy for atrial fibrillation: current anti-arrhythmic drugs, investigational agents, and innovative approaches. *Europace.* 2008 Jun;10(6):647–65. DOI: 10.1093/europace/eun130.
14. Gross MF, Castle NA, Mendoza S. US Patent 6395730. Published online 2002.
15. Jackson CM, Blass B, Coburn K, et al. Evolution of thiazolidine-based blockers of human Kv1.5 for the treatment of atrial arrhythmias. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 Jan 1;17(1):282–4. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.07.007.
16. Wu S, Fluxe A, Sheffer J, et al. Discovery and in vitro/in vivo studies of tetrazole derivatives as Kv1.5 blockers. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006 Dec 15;16(24):6213–8. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.09.021.
17. B Blass BE, Coburn K, Lee W, et al. Synthesis and evaluation of (2-phenethyl-2H-1,2,3-triazol-4-yl)(phenyl)methanones as Kv1.5 channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006 Sep 1;16(17):4629–32. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.06.001.
18. Blass BE, Fensome A, Trybulski E, et al. Selective Kv1.5 blockers: development of (R)-1-(methylsulfonylamino)-3-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-4-(4-methoxyphenyl)-2-imidazolidinone (KVI-020/WYE-160020) as a potential treatment for atrial arrhythmia. *J Med Chem.* 2009 Nov 12;52(21):6531–4. DOI: 10.1021/jm901042m.
19. Gross MF, Beaudoin S, McNaughton-Smith G, et al. Aryl sulfonamido indane inhibitors of the Kv1.5 ion channel. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 May 15;17(10):2849–53. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.02.052.
20. Gross MF, Castle NA, Zou A, et al. Aryl sulfonamido tetralin inhibitors of the Kv1.5 ion channel. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 Jun 1;19(11):3063–6. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.04.002.
21. Lloyd J, Atwal KS, Finlay HJ, et al. Benzopyran sulfonamides as Kv1.5 potassium channel blockers. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 Jun 15;17(12):3271–5. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.04.020.
22. Finlay HJ, Lloyd J, Nyman M, et al. Pyrano-[2,3b]-pyridines as potassium channel antagonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008 Apr 15;18(8):2714–8. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.03.026.

23. Fluxe A, Wu S, Sheffer JB, et al. Discovery and synthesis of tetrahydroindolone-derived carbamates as Kv1.5 blockers. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006 Nov 15;16(22):5855–8. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.08.059.
24. Wu S, Fluxe A, Janusz JM, et al. Discovery and synthesis of tetrahydroindolone derived semicarbazones as selective Kv1.5 blockers. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006 Nov 15;16(22):5859–63. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.08.057.
25. Vaccaro W, Huynh T, Lloyd J, et al. Dihydropyrazolopyrimidine inhibitors of K(V)1.5 (I(Kur)). *Bioorg Med Chem Lett.* 2008 Dec 15;18(24):6381–5. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.10.099.
26. Lloyd J, Finlay HJ, Vaccaro W, et al. Pyrrolidine amides of pyrazolodihydropyrimidines as potent and selective KV1.5 blockers. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010 Feb 15;20(4):1436–9. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.12.085.
27. Finlay HJ, Lloyd J, Vaccaro W, et al. Discovery of ((S)-5-(methoxymethyl)-7-(1-methyl-1H-indol-2-yl)-2-(trifluoromethyl)-4,7-dihydropyrazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)((S)-2-(3-methylisoxazol-5-yl)pyrrolidin-1-yl)methanone as a potent and selective I(Kur) inhibitor. *J Med Chem.* 2012 Apr 12;55(7):3036–48. DOI: 10.1021/jm201386u.
28. Blass B. Derivatives of heteroarylsulfonamides, their preparation, and their application in human therapy: patent highlight. *ACS Med Chem Lett.* 2012 Jul 2;3(8):618–9. DOI: 10.1021/ml3001598.
29. Yang Q, Fedida D, Xu H, et al. Structure-based virtual screening and electrophysiological evaluation of new chemotypes of K(v)1.5 channel blockers. *ChemMedChem.* 2010 Aug 2;5(8):1353–8. DOI: 10.1002/cmdc.201000162.
30. Yang Q, Du L, Tsai KC, Wang X, Li M, You Q. Pharmacophore Mapping for Kv1.5 Potassium Channel Blockers. *QSAR Comb Sci.* 2009;28(1):59–71. DOI: 10.1002/QSAR.200810050.
31. Guo X, Yang Q, Xu J, et al. Design and bio-evaluation of indole derivatives as potent Kv1.5 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2013 Nov 1;21(21):6466–76. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.08.041.
32. Guo X, Ma X, Yang Q, et al. Discovery of 1-aryloxyethyl piperazine derivatives as Kv1.5 potassium channel inhibitors (part I). *Eur J Med Chem.* 2014 Jun 23;81:89–94. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.03.075.

Комбинированное воздействие фабомотизола и соединения АЛМ-802 на деполяризацию предсердий в условиях трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии у крыс

© Смирнова С. Л.¹, Рощевская И. М.², Барчуков В. В.², Цорин И. Б.², Крыжановский С. А.²

¹ — ФГБУН Федеральный исследовательский центр

«Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук», Сыктывкар, Российская Федерация

² — ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность. Алкогольная кардиомиопатия (АКМП) является основной причиной летальности при хроническом алкоголизме, что во многом связано с высоким риском развития злокачественных нарушений сердечного ритма. Поиск новых лекарственных средств, в том числе обладающих выраженной антиаритмической активностью, представляется актуальным. **Цель** исследования: изучение влияния комбинированной терапии фабомотизолом и соединением АЛМ-802 на деполяризацию предсердий в условиях трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии у крыс. **Методы.** Изучена последовательность деполяризации эпикарда предсердий у крыс в условиях трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии, получавших после окончания 24-недельной алкоголизации ежедневно в течение 28 дней комбинацию фабомотизола и соединения АЛМ-802 или апирогенную воду внутривентриально. **Результаты.** В результате 28-дневного комбинированного действия фабомотизола и соединения АЛМ-802 у животных с алкогольной кардиомиопатией исчезают дополнительные области ранней активации в области лакун лёгочных вен, формирующиеся в период 24-недельной алкоголизации, риск предсердных аритмий минимизирован, восстанавливается последовательное распространение волны деполяризации от области синусно-предсердного узла, близкое к таковому у контрольных животных.

Ключевые слова: алкогольная кардиомиопатия; фабомотизол; соединение АЛМ-802; деполяризация предсердий

Для цитирования:

Смирнова С. Л., Рощевская И. М., Барчуков В. В., Цорин И. Б., Крыжановский С. А. Комбинированное воздействие фабомотизола и соединения АЛМ-802 на деполяризацию предсердий в условиях трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(2):14–19. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-14-19>

Поступила: 27 апреля 2023 г. **Принята:** 30 апреля 2023 г. **Опубликована:** 30 июня 2023 г.

Combined effect of fabomotizol and the compound ALM-802 on atrial depolarization in a translational model of alcoholic cardiomyopathy in rats

© Svetlana L. Smirnova¹, Irina M. Roshchevskaya², Vladimir V. Barchukov², Iosif B. Tsorin², Sergey A. Kryzhanovskii²

¹ — FRC "Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences", Syktyvkar, Russian Federation

² — FSBI "Research Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. Alcoholic cardiomyopathy (ACMP) is the leading cause of mortality in chronic disease, which is largely associated with an increased risk of developing malignant diseases of the cardiovascular disease. Search for new drugs, including those exhibiting pronounced antiarrhythmic activity, supposed relevance. **Objective.** To study the effect of combination therapy with fabomotizole and ALM-802 on atrial depolarization in a translational model of alcoholic cardiomyopathy in rats. **Methods.** The sequence of depolarization of the atrial epicardium was studied in rats in a translational model of alcoholic cardiomyopathy, which received a combination of fabomotizole and compound ALM-802 daily for 28 days after the end of 24 weeks of alcoholization, or pyrogen-free water intraperitoneally. **Results.** As a result of the 28-day combined action of fabomotizole and the compound ALM-802 in animals with alcoholic cardiomyopathy, additional areas of early activation in the area of lacunae of the pulmonary veins that form during the 24-week period of alcoholization disappear, the risk of atrial arrhythmias is minimized, and sequential propagation.

Keywords: alcoholic cardiomyopathy; fabomotizole; compound ALM-802; atrial depolarization

For citations:

Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Barchukov VV, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA. Combined effect of fabomotizol and the compound ALM-802 on atrial depolarization in a translational model of alcoholic cardiomyopathy in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(2):14–19. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-14-19>

Received: April 27, 2023. **Accepted:** April 30, 2023. **Published:** June 30, 2023.

Введение / Introduction

Алкогольная кардиомиопатия (АКМП) является основной причиной летальности при хроническом алкоголизме [1]. Риск внезапной сердечной смерти возрастает вдвое у лиц, страдающих алкогольной кардиомиопатией, по сравнению с непьющими [2]. Механизмы, ответственные за формирование электрической нестабильности миокарда при АКМП, до настоящего времени остаются не до конца изученными [3]. При разработке трансляционной модели

алкогольной кардиомиопатии у крыс было показано, что у животных со сформировавшейся АКМП резко снижается электрическая стабильность кардиомиоцитов [4]. Ранее у крыс с АКМП мы обнаружили значительную неоднородность последовательности деполяризации правого и левого предсердия и межпредсердной перегородки, вызванную формированием двух источников начальной предсердной активности в правом и левом предсердиях, которые могут приводить к возникновению предсердных аритмий [5].

В ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» под руководством академика РАН *Середенина С.Б.* создан и фармакологически изучен оригинальный анксиолитик фабомотизол (афобазол), который кроме анксиолитической активности обладает кардиопротективным действием [6], а так же было сконструировано соединение АЛМ-802 (тригидрохлорид N1-(2,3,4-триметоксибензил)-N2-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина), имеющее выраженную антиишемическую (в условиях модели субэндокардиальной ишемии) и антиаритмическую (на моделях аконитиновой аритмии) активность [7].

Цель исследования: изучение влияния комбинированной терапии фабомотизолом и соединением АЛМ-802 на деполяризацию предсердий в условиях трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии у крыс.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 160–180 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали в индивидуальных клетках стандарта Т/3 в условиях вивария ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (температура 21–23 °С, относительная влажность воздуха 40–60 %) при регулируемом 12 ч/12 ч световом режиме (свет/темнота) с предоставлением брикетированного корма *ad libitum* в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/ЕЕС)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Экспериментальный протокол. Животные были разделены на две группы: 1-ая ($n = 9$) — интактные животные; 2-ая ($n = 12$) — с алкогольной кардиомиопатией (АКМП). Крысы с АКМП в свою очередь были рандомизированы на две подгруппы: контроль АКМП ($n = 6$) и АКМП, получавшие комбинацию фабомотизола и соединения АЛМ-802 ($n = 6$).

Комбинацию (фабомотизол 15 мг/кг + соединение АЛМ-802 2 мг/кг) в 0,2–0,3 мл апиrogenной воды для инъекций животным с АКМП, а в контрольных сериях (группа № 1 и контроль АКМП) — апиrogenную воду для инъекций (0,2–0,3 мл) вводили в/б после

окончания 24-недельной алкоголизации, ежедневно в течение 28 дней. Объём вводимой жидкости составлял 1 мл на 1 кг массы животного. Оценку электрофизиологических показателей предсердий производили на следующий день после последней инъекции.

Экспериментальная модель: в качестве экспериментальной модели АКМП использовали разработанную нами ранее трансляционную модель у крыс [8], согласно которой АКМП у беспородных крыс-самцов формируется к концу 24-й недели принудительной алкоголизации 10 % раствором этанола в качестве единственного источника жидкости (среднесуточное потребление этанола 5,0–6,5 г/кг).

Электрофизиологическое исследование. Последовательность деполяризации эпикарда предсердий была оценена методом синхронной многоканальной кардиоэлектрохронотопографии. Для этой цели наркотизированных крыс (золетил 1 мг/кг, в/м) после трахеотомии переводили на искусственное дыхание при помощи аппарата искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия). Частоту и глубину дыхания подбирали индивидуально для каждого животного. После вскрытия грудной клетки и обнажения сердца на эпикард обоих предсердий накладывали многоканальные поверхностные электроды для синхронной регистрации 40 униполярных эпикардиальных электрограмм относительно объединённого отведения от конечностей. Синхронно с эпикардиальными предсердными электрограммами регистрировали биполярные ЭКГ в отведениях от конечностей. Данные обрабатывали при помощи системы «Кардиоинформ». Момент прихода волны возбуждения в каждую точку отведения определяли по минимуму первой производной потенциала по времени и строили хронотопографическую карту последовательности деполяризации. Время указано в мс относительно пика R на ЭКГ во II отведении от конечностей.

Статистика. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Нормальность распределения выборок проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Так как распределение выборок было близко к нормальному, то статистическую значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты / Results

Волна возбуждения по эпикарду предсердий у крыс контрольной группы равномерно распространяется от области синусно-предсердного узла, расположенного около верхней полой вены, в правое и левое предсердия. Спустя $5,9 \pm 1,2$ мс после начала возбуждения области верхней полой вены, волна деполяризации по межпредсердной перегородке переходит в среднюю часть левого предсердия (табл. 1). По левому предсердию волна воз-

Таблица 1

Временные характеристики деполяризации эпикарда предсердий крыс при алкогольной кардиомиопатии при действии препаратов АЛМ-802 и фабомотизола

Table 1

Time characteristics of depolarization of the atrial epicardium in rats with alcoholic cardiomyopathy under the action of drugs ALM-802 and fabomotizol

Животные /Animals Показатели / Indicators	Контрольные/ Control n = 9	Контроль АКМП/ Control АСМ n = 6	АКМП, фабомотизол и АЛМ-802 / АСМ, fabomotizole hydrochloride and ALM-802 n = 6
Начало деполяризации эпикарда предсердий, мс / The beginning of atrial epicardial depolarization, ms [#]	-70,3±5,8	-69,9±3,4	-65,3±5,3
Время перехода волны деполяризации с правого на левое предсердие, мс / Time of transition of the depolarization wave from the right to the left atrium, ms [#]	-63,2±4,6	-60,8±4,1	-61,0±3,4
Время окончания деполяризации эпикарда предсердий, мс / End time of atrial epicardial depolarization, ms [#]	-58,0±6,2	-57,0±5,51	-55,2±4
Длительность деполяризации правого предсердия, мс / Duration of depolarization of the right atrium, ms	4,1±2,1	4,7±2,2	7,1±2*
Длительность деполяризации левого предсердия, мс / Duration of depolarization of the left atrium, ms	5,9±1,3	5,8±1,1	6,4±0,8
Длительность деполяризации эпикарда предсердий, мс / Duration of depolarization of the atrial epicardium, ms	11,9±2,7	12,0±2,9	10,2±1,6
Время формирования дополнительного очага возбуждения в области впадения лёгочных вен в левое предсердие, мс / The time of formation of an additional focus of excitation in the area where the pulmonary veins flow into the left atrium, ms	нет	6,1±2,1 мс	нет

Примечания: # — Время указано в мс, относительно пика R_п; * — достоверное различие по сравнению с интактными (p = 0,016).
Notes: # — The time is indicated in ms, relative to the R_п peak; * — a significant difference compared to the intact ones (p = 0.016).

буждения равномерно распространяется, деполяризуя ушко левого предсердия. На дорсальной стороне левого ушка заканчивается деполяризация предсердий.

У крыс со сформировавшейся АКМП на эпикарде предсердий формируется дополнительный очаг возбуждения после начала возбуждения области верхней полой вены (от синусно-предсердного узла). Дополнительная зона раннего возбуждения расположена в области лакун лёгочных вен в левом предсердии. От зоны ранней активации в области лакун лёгочных вен волна возбуждения распространяется к ушку левого предсердия и межпредсердной перегородке и сливается с фронтом деполяризации, движущимся со стороны правого предсердия от синусно-предсердного узла. Общая длительность деполяризации эпикарда предсердий у крыс со сформировавшейся АКМП незначительно отличается от таковой у контрольных животных (см. табл. 1).

В отличие от крыс со сформировавшейся АКМП, у животных, после формирования АКМП длительно получавших комбинацию препаратов — фабомотизола и соединения АЛМ-802, — на эпикарде предсердий наблюдается равномерное распространение волны деполяризации, близкое к таковому у животных контрольной группы. Волна возбуждения по эпикарду от области синусно-предсердного узла (расположенного

около верхней полой вены) распространяется последовательно на правое предсердие, по межпредсердной перегородке — на левое предсердие. Деполяризация предсердий заканчивается на дорсальной стороне левого ушка. Общая длительность деполяризации эпикарда предсердий у животных с АКМП, проходивших 28-дневное лечение комбинацией препаратов, практически не отличается от контрольных животных (см. табл. 1), длительность деполяризации левого предсердия незначительно изменяется при формировании АКМП у крыс и при последующем лечении. Длительность деполяризации правого предсердия, недостоверно увеличившаяся у крыс с АКМП, при длительном воздействии комбинацией препаратов существенно увеличивается и наблюдается достоверное увеличение длительности деполяризации правого предсердия по сравнению с контрольными животными. В области впадения лёгочных вен в левое предсердие у животных со сформировавшейся АКМП, длительное время получавших комбинацию препаратов — фабомотизола и соединения АЛМ-802, не формируется дополнительный очаг возбуждения в области лакун лёгочных вен в левом предсердии, общая картина последовательности деполяризации предсердий практически не отличается от контрольных животных.

Обсуждение / Discussion

Возникновение эктопических очагов возбуждения и фибрилляции предсердий связано с наличием пейсмейкерно-подобных клеток в зоне лакун лёгочных вен в левом предсердии [9, 10], которые в определённых условиях начинают функционировать в качестве дополнительных источников активации. При алкогольной кардиомиопатии у крыс ранее нами было выявлено увеличение неоднородности деполяризации правого и левого предсердий и межпредсердной перегородки, вызванное формированием двух источников ранней начальной активации в правом и левом предсердиях [5].

В возникновении и поддержании фибрилляции предсердий участвуют множественные волны рентри, которые могут функционировать одновременно в левом и правом предсердии [11]. Количество волн в любой момент времени зависит от скорости предсердного проведения, рефрактерного периода и массы миокарда предсердий [12].

У всех обследованных нами крыс со сформировавшейся АКМП на субэпикарде предсердий в области лакун лёгочных вен формируется ранний очаг начальной предсердной активности. У всех обследованных нами животных со сформировавшейся в течение 24 недель алкоголизации АКМП в результате длительного 28-дневного введения фабомотизола и соединения АЛМ-802 исчезает дополнительный очаг возбуждения в области впадения лёгочных вен в левое предсердие, на эпикарде предсердий наблюдается равномерное распространение волны деполяризации, близкое к таковому у контрольных животных. При анализе временных характеристик деполяризации субэпикарда предсердий у животных после длительного введения фабомотизола и соединения АЛМ-802 не выявлено статистически значимых изменений длительности деполяризации обоих предсердий, левого и правого предсердия.

Препарат фабомотизол (7–10 — 15 мг/кг, в/в) в экспериментах проявляет выраженную антиаритмическую активность [13, 14]. Антиаритмические эффекты фабомотизола реализуются на уровне сердечной мышцы и полностью блокируются антагонистом σ -рецепторов галоперидолом [15].

На фоне курсовой терапии фабомотизолом (15 мг/кг, в/б) ежедневно в течение 28 дней, начатой по окончании 24-й недели алкоголизации, по сравнению с алкоголизированным контролем значимо уменьшается жировая дистрофия миокарда желудочков и восстанавливается порог электрической фибрилляции желудочков сердца. Согласно результатам молекулярных исследований, фабомотизол значимо подавляет выявленную у контрольных алкоголизированных животных аномальную экспрессию мРНК генов для ключевых рецепторов и белков, ответственных за поддержание в кардиомиоцитах гомеостаза ионов Ca^{++} и регуляцию их ритмической активности: регуляторных белков *Eras1* ($p = 0,021$), *Eras2* ($p = 0,018$), *CaM*

($p = 0,00001$), а также *RyR2* ($p = 0,031$), *IP3R2* ($p = 0,006$) рецепторов [16].

Фабомотизол эффективно препятствует развитию фибрилляции предсердий на модели ваготонической фибрилляции предсердий [14]. Сглаживание фабомотизолом изменений в соотношении деполяризации правого и левого предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда свидетельствует о наличии у препарата антиаритмического действия [17].

Соединение АЛМ-802 обладает сложным механизмом кардиопротективного действия, включающего в себя блокаду трансмембранных, потенциалзависимых Na^{+} - и K^{+} -каналов, ингибирование рианодиновых рецепторов 2 типа (*RyR2*). Соединение АЛМ-802 препятствовало развитию желудочковых аритмий у крыс на моделях аконитиновой и хлорид кальциевой аритмии, увеличивало порог электрической фибрилляции желудочков сердца крыс с 2 до 10 мА [7, 18].

Таким образом, показано, что в результате курсовой комбинированной терапии животных со сформированной АКМП существенно изменяется картина последовательности деполяризации левого предсердия при практически неизменной картине деполяризации правого предсердия, значительно изменяется соотношение последовательностей возбуждения правого и левого предсердий, при сохранении временных параметров активации субэпикарда обоих предсердий и значительном увеличении длительности деполяризации правого предсердия, что позволяет говорить об синергии антиаритмической активности фабомотизола и соединения АЛМ-802.

Заключение / Conclusion

Полученные данные свидетельствуют о том, что на фоне курсовой комбинированной терапии фабомотизолом и соединением АЛМ-802 у животных со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией происходит подавление активности аномального очага деполяризации, расположенного в области лакун лёгочных вен, на эпикарде предсердий восстанавливается последовательное распространение волны деполяризации от области синусно-предсердного узла, близкое к таковому у контрольных животных. Полученные данные позволяют говорить о том, что у животных с алкогольной кардиомиопатией, длительное время получавших фабомотизол и соединение АЛМ-802, риск развития предсердных аритмий и фибрилляции предсердий минимизирован.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

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

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Смирнова Светлана Леонидовна

e-mail: smirnova.sl@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4292-2444>
SPIN-код: 7341-0013
к. б. н., зав. отделом сравнительной
кардиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,
Сыктывкар, Российская Федерация

Svetlana L. Smirnova

e-mail: smirnova.sl@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4292-2444>
SPIN code: 7341-0013
PhD, Cand. Sci. Biology, head of the department
Comparative Cardiology FRC Komi SC UB RAS,
Syktyvkar, Russian Federation

Рощевская Ирина Михайловна

Автор, ответственный за переписку
e-mail: compcard@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6108-1444>
SPIN-код: 5424-2991
д. б. н., член-корреспондент РАН, г. н. с.
лаборатории фармакологического скрининга
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Заку-
сова», Москва, Российская Федерация

Irina M. Roshchevskaya

Corresponding author
e-mail: compcard@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6108-1444>
SPIN code: 5424-2991
Dr. Sci. (Biol.), Corresponding Member RAS,
Chief Researcher of the Laboratory of Pharma-
cological Screening FSBI “Zakusov Institute of
Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Барчуков Владимир Валерьевич

e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4229-3107>
SPIN-код: 6743-4280
н. с. лаборатории фармакологического
скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Vladimir V. Barchukov

e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4229-3107>
SPIN code: 6743-4280
Research scientist of laboratory of pharmacological
screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”,
Moscow, Russian Federation

Цорин Иосиф Борисович

e-mail: tsorin@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
SPIN-код: 4015-3025
д. б. н., в. н. с. лаборатории
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва,
Российская Федерация

Iosif B. Tsorin

e-mail: tsorin@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
SPIN code: 4015-3025
Dr. Sci. (Biol.), Leading researcher of laboratory of
pharmacological screening FSBI “Zakusov Institute
of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Крыжановский Сергей Александрович

e-mail: SAK-538@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
SPIN-код: 6596-4865
д. м. н., зав. лабораторией фармакологического
скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Sergey A. Kryzhanovskii

e-mail: SAK-538@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
SPIN code: 6596-4865
Dr. Sci. (Med.), Head of laboratory of pharmaco-
logical screening FSBI “Zakusov Institute of Phar-
macology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

- Семенова В.Г., Антонова О.И., Евдокushкина Г.Н., Гаврилова Н.С. Потери населения России в 2000–2008 гг., обусловленные алкоголем: масштабы, структура, тенденции. *Социальные аспекты здоровья населения*. 2010;14(2):34–37. [Semenova VG, Antonova OI, Evdokushkina GN, Gavrilova NS. Losses of the population of Russia in 2000–2008 caused by alcohol: scales, structure, and tendencies. *Social'nyye aspekty zdorov'a naseleniya / Social aspects of population health*. 2010;14(2):34–37. (In Russ).].
- Vikhert AM, Tsiplenkova VG, Cherpachenko NM. Alcoholic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol*. 1986 Jul; 8(1 Suppl A):3A–11A. DOI: 10.1016/s0735-1097(86)80023-7.
- Pfeiffer D, Jurisch D, Neef M, Hagendorff A. Alcohol und Rhythmusstörungen [Alcohol and arrhythmias]. *Herz*. 2016 Sep;41(6): 498–502. *German*. DOI: 10.1007/s00059-016-4463-z.
- Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Колик Л.Г., и др. Трансляционная модель алкогольной кардиомиопатии. *Молекулярная медицина*. 2015;(3):40–47. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Kolik LG, et al. Translation model of alcoholic cardiomyopathy. *Molecular medicine*. 2015;(3):40–47. (In Russ).].
- Смирнова С.Л., Рошевская И.М., Рошевский М.П., и др. Деполаризация предсердий у крыс с алкогольной кардиомиопатией. *Доклады академии наук*. 2018;479(1):96–98. [Smirnova SL, Roshevskaya IM, Roshchevsky MP, et al. Atria depolarization in rats with alcoholic cardiomyopathy. *Doklady Biological Sciences*. 2018;479(1):41–43. (In Russ).]. DOI: 10.1134/S0012496618020035.
- Крыжановский С.А., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., и др. Плейотропные (кардиотропные) эффекты анксиолитика афобазола. *Терапевт*. 2012;(1):32–40. [Kryzhanovskii SA, Stolyaruk VN, Vititnova MB, et al. Pleiotropic (cardiotropic) effects of the anxiolytic afobazole. *Therapist*. 2012;(1):32–40. (In Russ).].
- Мокров Г.В., Лихошерстов А.М., Барчуков В.В., и др. Исследование влияния положения метокси-группы на кардиотропную активность соединения АЛМ-802. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2019;(1):6–11. [Mokrov GV, Likhosherstov AM, Barchukov VV, et al. Study of methoxy-group position influence on compound alm-802 cardiotropic activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;(1):6–11. (In Russ).]. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10033.
- Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б., и др. Алкогольная кардиомиопатия: трансляционная модель. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017;163(5):582–586. [Kryzhanovskii SA, Kolik LG, Tsorin IB, et al. Alcoholic Cardiomyopathy: Translation Model. *Bull Exp Biol Med*. 2017 Sep;163(5):627–631. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-017-3865-0.
- Jais P, Haïssaguerre M, Shah DC, et al. A focal source of atrial fibrillation treated by discrete radiofrequency ablation. *Circulation*. 1997 Feb 4;95(3):572–576. DOI: 10.1161/01.cir.95.3.572.
- Chen YJ, Chen SA. Electrophysiology of pulmonary veins. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006;17:220–224. DOI: 10.1111/j.1540-8167.2005.00317.x.
- Татарский Р.Б., Родионов В.А., Егай Ю.В., и др. Влияние электрофизиологических механизмов развития фибрилляции предсердий на объем оперативного вмешательства. *Сибирский медицинский журнал*. 2015;30(1):49–55. [Tatarsky RB, Rodionov VA, Yegay YuV, et al. Effects of the electrophysiological mechanisms of atrial fibrillation on the extent of surgical intervention. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;30(1): 49–55. (In Russ).]. DOI: 10.29001/2073-8552-2015-30-1-49-55.
- Морчек ГА, Ганчарик ДБ, Часнойть АР и др. Этиология, механизмы возникновения и фармакотерапия пациентов с фибрилляцией предсердий. *Кардиология в Беларуси*. 2009; 1(2):32–45. [Morchek GA, Gancharik DB, Chasnoyt AR, et al. Etiology, mechanisms of occurrence and pharmacotherapy of patients with atrial fibrillation. *Cardiology in Belarus*. 2009; 1(2):32–45. (In Russ).].
- Столярук В.Н., Вититнова МБ, Крыжановский С.А. Изучение эффектов афобазола на модели реперфузионных аритмий. *Вестник РАМН*. 2010;4:41–45. [Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA. Investigation of Afobazol Effects on a Model of Reperfusion Arrhythmias. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2010;(4):41–45. (In Russ).].
- Столярук В.Н., Вититнова МБ, Цорин ИБ, Крыжановский С.А. Оценка эффективности афобазола на модели ваготонической фибрилляции предсердий. *Вестник РАМН*. 2010;(4): 49–52. [Stolyaruk VN, Vititnova MB, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA. Evaluation of Afobazol Efficiency on a Model of Vagotonic Atrial Fibrillation. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2010;(4):49–52. (In Russ).].
- Столярук В.Н., Вититнова МБ, Цорин ИБ, Крыжановский С.А. Изучение противofiбрилляторной активности афобазола у животных с интактным и денервированным миокардом. *Вестник РАМН*. 2010;(4):45–48. [Stolyaruk VN, Vititnova MB, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA. Study of the antifibrillatory activity of afobazole in animals with intact and denervated myocardium. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2010;(4):45–48. (In Russ).].
- Мирошкина И.А., Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., и др. К механизму антиаритмического действия фабототизола дигидрохлорида при алкогольной кардиомиопатии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):30–37. [Miroshkina IA, Kozhevnikova LM, Tsorin IB, et al. On the mechanism of the antiarrhythmic action of fabomotizole hydrochloride in alcoholic cardiomyopathy. *Farmakokinetika i farma-kodinamika*. 2021;(1):30–37. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-1-30-37.
- Смирнова С.Л., Рошевская И.М., Цорин И.Б., Крыжановский С.А. Влияние анксиолитика фабототизола на временные параметры деполаризации предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(4):20–25. [Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA. Effect of the anxiolytic fabomotizol on the time parameters of atrial depolarization in the acute phase of myocardial infarction. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(4):20–25. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2022-4-20-25.
- Мокров Г.В., Лихошерстов А.М., Барчуков В.В., и др. Исследование кардиотропной активности орто-алкокси аналогов соединения АЛМ-802. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2019;(4):18–23. [Mokrov GV, Likhosherstov AM, Barchukov VV, et al. Study of ALM-802 orto-alkoxy analogues cardiotropic activity. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2019;(4):18–23. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-18-23.

Исследование антиаритмической активности линейных алкоксифенилазаалканов на модели реперфузионных аритмий у крыс

© Барчуков В. В., Столярук В. Н., Цорин И. Б., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А., Воробьева Т. Ю., Бирюкова В. Е., Мокров Г. В.

ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Проведён анализ взаимосвязи структуры и антиаритмической активности бис-алкоксифенилтриазаалканов **1** и бис-алкоксифенилдиазалканов **2** на модели реперфузионной аритмии у крыс. Установлено, что ключевыми требованиями к активности соединений на данной модели является использование 2,3,4-триметоксифенильных ароматических фармакофоров и наличие центрального атома азота в линкере. Наиболее активными соединениями оказались тригидрохлорид $N^1-(2,3,4\text{-триметоксибензил})-N^2-[2-[(2,3,4\text{-триметоксибензил})\text{амино}]\text{этил}]-1,2\text{-этандиамина}$ и тригидрохлорид $N^1-(2,3,4\text{-триметоксибензил})-N^3-[3-[(2,3,4\text{-триметоксибензил})\text{амино}]\text{этил}]-1,3\text{-пропандиамина}$ (шифры АЛМ-802 и АЛМ-811), значимо ($p < 0,001$) препятствовавшие развитию желудочковых тахикардий и/или фибрилляций желудочков.

Ключевые слова: биароматические кардиопротекторы; мультитаргетный механизм действия; антиаритмическая активности; линейные метоксифенилазаалканы; АЛМ-802

Для цитирования:

Барчуков В. В., Столярук В. Н., Цорин И. Б., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А., Воробьева Т. Ю., Бирюкова В. Е., Мокров Г. В. Исследование антиаритмической активности линейных алкоксифенилазаалканов на модели реперфузионных аритмий у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(2):20–28. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-20-28>

Поступила: 20 апреля 2023 г. **Принята:** 21 апреля 2023 г. **Опубликована:** 30 июня 2023 г.

Study of the antiarrhythmic activity of linear alkoxyphenylazalkanes in the model of reperfusion arrhythmias in rats

© Vladimir V. Barchukov, Valeriy N. Stolyaruk, Iosif B. Tsorin, Marina B. Vititnova, Sergey A. Kryzhanovskii, Tatyana Yu. Vorobieva, Valentina E. Biryukova, Grigory V. Mokrov
"Research Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. The antiarrhythmic activity of bis-alkoxyphenyltriazalkanes **1** and bis-alkoxyphenyldiazaalkanes **2** was analyzed in a model of reperfusion arrhythmia in rats. It was found that the key requirements for the compounds activity in this model are the use of 2,3,4 trimethoxyphenyl aromatic pharmacophores and the presence of a central nitrogen atom in the linker. The most active compounds were ALM-802 (trihydrochloride $N^1-(2,3,4\text{-trimethoxybenzyl})-N^2-[2-[(2,3,4\text{-trimethoxybenzyl})\text{amino}]\text{ethyl}]-1,2\text{-ethanediamine}$) and ALM-811 ($N^1-(2,3,4\text{-trimethoxybenzyl})-N^3-[3-[(2,3,4\text{-trimethoxybenzyl})\text{amino}]\text{ethyl}]-1,3\text{-propanediamine trihydrochloride}$), which significantly prevented the development of ventricular tachycardias and/or ventricular fibrillation.

Keywords: biaromatic cardioprotectors; multitarget mechanism of action; antiarrhythmic activity; linear methoxyphenylazaalkanes; ALM-802

For citations:

Barchukov VV, Stolyaruk VN, Tsorin IB, Vititnova MB, Kryzhanovsky SA, Vorobieva TYu, Biryukova VE, Mokrov GV. Study of the antiarrhythmic activity of linear alkoxyphenylazalkanes in the model of reperfusion arrhythmias in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(2):20–28. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-20-28>

Received: April 20, 2023. **Accepted:** April 21, 2023. **Published:** June 30, 2023.

Введение / Introduction

Ранее нами было установлено, что среди веществ с кардиопротекторными свойствами самых различных классов может быть выделена единая общая фармакофорная модель, которой соответствует большое количество представителей каждого из них [1–5]. В этой модели присутствуют два ароматических ядра, связанных линейным линкером длиной от 5 до 15 связей, который содержит как минимум один, но чаще несколько гетероатомов, прежде всего, атомы азота и кислорода. На рисунке 1 приведены примеры препаратов различных классов, соответствующих данной фармакофорной модели. Это блокатор HCN-каналов ивабрадин [2], блокатор кальциевых каналов верапамил [1], блокатор натриевых каналов ранолазин [3] и блокатор калиевых каналов дофетилид [4]. Вы-

явление данной обобщённой фармакофорной модели позволило нам выдвинуть гипотезу о возможности создания в её рамках кардиопротекторных средств с мультитаргетным механизмом действия. Эта гипотеза находит подтверждение в том, что и подавляющее большинство биароматических лекарственных средств, отвечающих предложенной фармакофорной модели, имеют комплексный механизм действия. Например, верапамил, помимо кальциевых каналов, способен блокировать некоторые натриевые и калиевые каналы [6].

С использованием данной фармакофорной модели нами в течение нескольких лет реализуется программа по созданию биароматических соединений с линейным линкером в качестве потенциальных кардиопротекторных средств с мультитаргетным механизмом действия. При этом нами было выявлено несколько активных групп, относящихся к общему классу бис-

алкоксифенилаалканов (1–4) [7–10]. Среди них — линейные бис-алкоксифенилтриаалканы **1** [7] и бис-алкоксифенилдиаалканы **2** [10]; 1-(алкоксибензил)-4-[2-((алкоксибензил)амино)этил]пиперазины **3** [8], 1-(алкоксибензил)-4-[2-((алкоксибензил)амино)этил]пиперазин-2,3-дионы **4** [9] (рис. 1).

Анализ биологической активности соединений **1–4** показал, что лучшим спектром эффектов обладали производные **1** и **2** с конформационно-свободным линейным линкером без циклических фрагментов [7, 10]. Некоторые из представителей этих групп проявляют антиаритмическую/антифибрилляторную активность

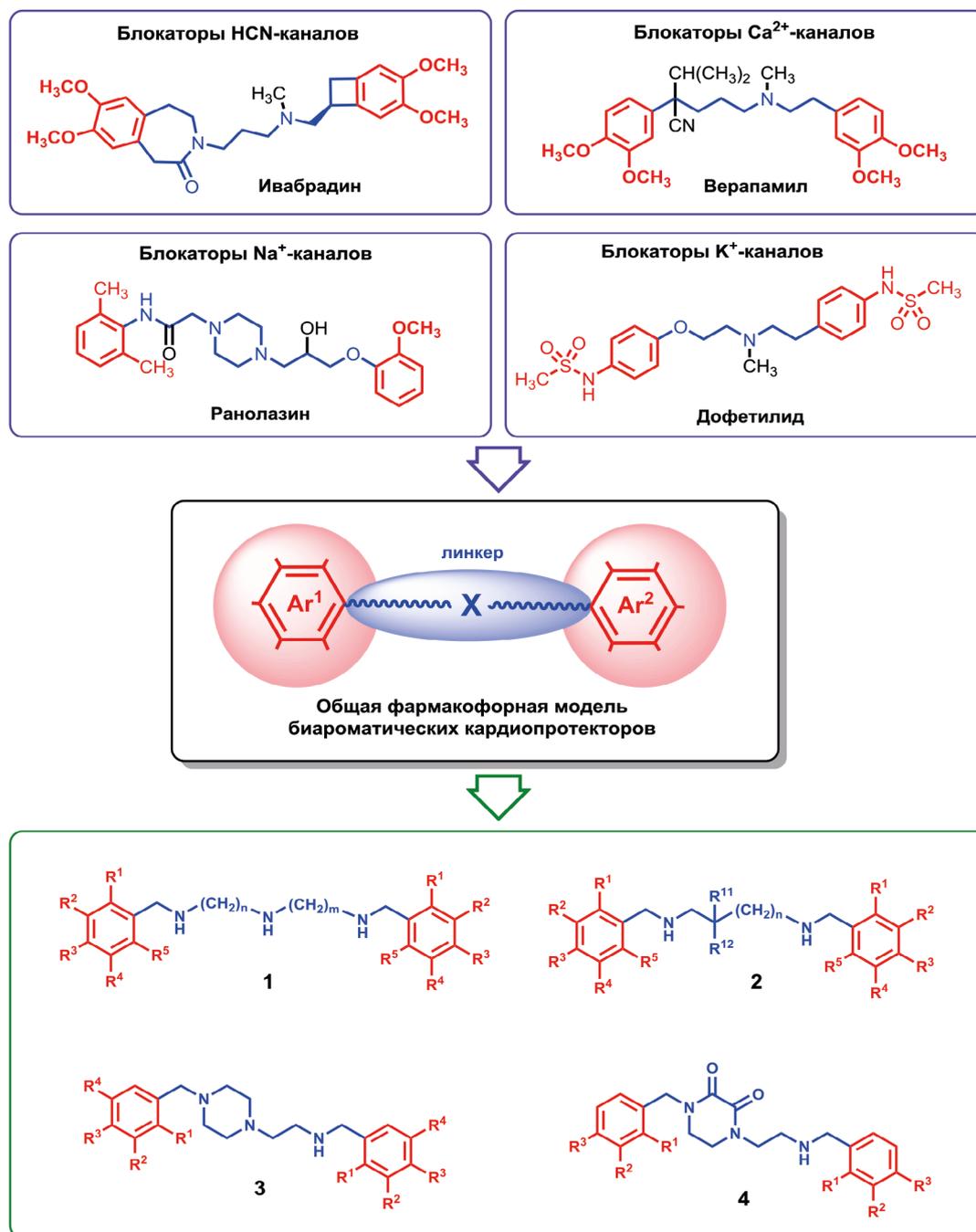


Рис. 1. Общая фармакофорная модель кардиопротекторных соединений с биароматической структурой. Некоторые представители различных классов кардиопротекторов, соответствующих данной фармакофорной модели. Бис-алкоксифенилаалканы (**1–4**), сконструированные нами ранее

Fig. 1. General pharmacophore model of cardioprotective compounds with a biaromatic structure. Some representatives of various classes of cardioprotectors corresponding to this pharmacophore model. Bis-alkoxyphenylazaalkanes (**1–4**) constructed by us earlier

на моделях аконитиновой, хлоридкальциевой аритмий и модели электрической фибрилляции желудочков сердца у крыс, а также антиишемическую активность на модели изопротереноловой ишемии. В частности, соединение-лидер АЛМ-802 (тригидрохлорид N^1 -(2,3,4-триметоксибензил)- N^2 -{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]-этил}-1,2-этандиамина) обладало выраженной активностью в условиях всех перечисленных моделей в дозах 1–2 мг/кг.

Анализ механизма действия соединения АЛМ-802 подтвердил гипотезу о его мультитаргетности. Методом patch-clamp в конфигурации whole cell на культуре нейронов гиппокампа крыс было установлено, что АЛМ-802 эффективно блокирует трансмембранные потенциалзависимые Na^+ - и K^+ -каналы (IC_{50} = 94 и 67 мкМ, соответственно) [11]. В экспериментах на модели хронической постинфарктной сердечной недостаточности у крыс методом ПЦР в реальном масштабе времени показано, что соединение АЛМ 802 (ежедневно в дозе 2 мг/кг, в/б, в течение 28 сут., с 91-х суток от момента воспроизведения инфаркта миокарда) восстанавливает в миокарде уровень экспрессии генов β_1 - и β_2 -адренорецепторов, а также риаудиновых рецепторов 2-го типа, сниженную у контрольных животных [12]. Кроме того, соединение АЛМ-802 в экспериментах *in vitro*, выполненных на изолированной полоске миокарда, полностью блокирует её положительный инотропный ответ на кофеин (агонист $RyR2$), что позволяет предположить, что оно обладает свойствами антагониста $RyR2$. Полученные данные свидетельствуют о том, что соединение АЛМ-802, как минимум, сочетает свойства антиаритмических средств I и III классов по классификации Vaughan Williams и проявляет антагонистическую активность в отношении $RyR2$.

Целью настоящей работы являлось дальнейшее исследование кардиопротекторных свойств бис-алкоксифенилтриазаалканов **1** и бис-алкоксифенилдиазаалканов **2**. Для этого нами была выбрана модель реперфузионной аритмии у крыс, в которой наиболее эффективными являются антиаритмики IA, IC и IV классов по классификации Vaughan Williams [13].

Реперфузионное повреждение миокарда впервые было описано американским физиологом Робертом Дженнингсом в 1960 году [14]. Известно, что через 15–20 секунд после окклюзии коронарного сосуда кардиомиоциты переходят с аэробного на анаэробный гликолиз, который становится единственным значимым источником АТФ, однако это приводит к накоплению лактата и, следовательно, понижению внутриклеточного pH (до <7,0) вследствие накопления в цитозоле избыточного количества протонов [15]. Реперфузия сопровождается быстрым восстановлением внутриклеточного pH за счёт активации сарколеммального Na^+/H^+ ионообменника, который «выталкивает» протоны из клетки в обмен на поступление в цитозоль ионов Na^+ [15, 16]. Возникающее

в результате этого увеличение содержания в цитозоле кардиомиоцитов ионов Na^+ , в свою очередь, активирует сарколеммальный $2Na^+/Ca^{2+}$ ионообменник, что приводит к обмену внутриклеточных ионов Na^+ на внеклеточные ионы Ca^{2+} [17]. Высокая скорость работы $2Na^+/Ca^{2+}$ ионообменника может в конечном итоге привести к перегрузке кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} , которые, в частности, инициируют выработку АФК в митохондриях [18, 19]. Показано, что при реперфузии главным источником АФК становятся митохондрии, что происходит в результате открытия Ca^{2+} -зависимой неспецифической митохондриальной поры (mPTP). Главным активатором mPTP в условиях реперфузии являются ионы Ca^{2+} , при этом чувствительность к ним многократно увеличивается в условиях сопутствующего реперфузии окислительного стресса [20]. Этот феномен получил название АФК-индуцированный выход АФК («ROS – induced ROS releas» (RIRR)) [21]. Избыточное накопление ионов Ca^{2+} и выработка АФК создают идеальную внутриклеточную среду для активации СаМКП, которая играет главную роль в генерации реперфузионных аритмий [22]. Свои аритмогенные эффекты СаМКП реализует посредством фосфорилирования и последующей активации $RyR2$ [23].

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. В экспериментах использовали белых беспородных крыс-самцов массой 200–380 г. Все животные были получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/ЕЕС)), а также в соответствии с Правилами работы с животными, утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Соединения. В работе были использованы следующие производные бис-алкоксифенилтриазаалканов **1** и бис-алкоксифенилдиазаалканов **2**, которые были синтезированы по описанным ранее методикам [7, 10]: АЛМ-802 (тригидрохлорид N^1 -(2,3,4-триметоксибензил)- N^2 -{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина), АЛМ-803 (тригидрохлорид N^1 -(3,4,5-триметоксибензил)- N^2 -{2-[(3,4,5-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина), АЛМ-811 (тригидрохлорид N^1 -(2,3,4-триметоксибензил)- N^3 -{3-[(2,3,4-триметок-

сibenзил)амино]этил}-1,3-пропандиамина), АЛМ-812 (тригидрохлорид N^1 -(2,4-диметоксибензил)- N^2 -{2-[(2,4-диметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина), АЛМ-815 (тригидрохлорид N^1 -(2,3-диметоксибензил)- N^2 -{2-[(2,3-диметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина), АЛМ-821 (тригидрохлорид N^1 -(2,5-диметоксибензил)- N^2 -{2-[(2,5-диметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина), АЛМ-843 (тригидрохлорид N^1 -(3,4-диметоксибензил)- N^2 -{2-[(3,4-диметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина), АЛМ-844 (дигидрохлорид N^1, N^5 -бис(2,3,4-триметоксибензил)-пентан-1,5-диамина), АЛМ-845 (дигидрохлорид N^1, N^6 -бис(2,3,4-триметоксибензил)-гексан-1,6-диамина).

Модель реперфузионных нарушений ритма сердца у крыс. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 200–380 г. Наркотизированных животных (уретан 1300 мг/кг, в/б) фиксировали на операционном подогреваемом столике Surgi Suite (Kent Scientific Corporation, США) в положении на спине. Для введения изучаемых соединений катетеризировали бедренную вену. Затем животных переводили на искусственное дыхание, вентиляцию осуществляли аппаратом искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия). Далее производили тороко- и перикардотомию и под левую нисходящую коронарную артерию сразу же после её выхода из-под ушка подводили лавсановую лигатуру. Ишемию миокарда вызывали одномоментной перевязкой коронарной артерии. Через 7 минут лигатуру снимали. Оценивали наличие/отсутствие фибрилляции желудочков сердца в течение 3 минут от момента начала реперфузии. Животные, у которых не происходило восстановления кровотока в ишемизированной зоне, исключались из экспе-

римента. Регистрацию ЭКГ начинали за минуту до перевязки коронарного сосуда и продолжали в течение всего эксперимента. Для мониторинга, регистрации и обработки ЭКГ использовали компьютерный электрокардиограф «Полиспектр 8/ЕХ» (Нейрософт, Россия).

Животные были рандомизированы в группы, которым вводились исследуемые вещества, в группу препарата сравнения верапамила и в контрольные группы. Число животных в группах составляло от 8 до 13. Животным контрольных групп за 5 минут до начала реперфузии внутривенно вводили эквивалентный объём (1 мл/кг) изотонического 0,9 % раствора натрия хлорида, а животные опытных групп по аналогичной схеме внутривенно получали исследуемые соединения или препарат сравнения.

Для оценки антиаритмического эффекта в каждой группе подсчитывали число животных, у которых развивались и у которых отсутствовали жизнеугрожающие аритмии (желудочковая тахикардия (ЖТ), фибрилляция желудочков (ФЖ)).

Статистическая обработка. Статистическую значимость различий между экспериментальными выборками определяли с помощью метода точной вероятности Фишера с учётом множественности сравнений. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение / Results and their discussion

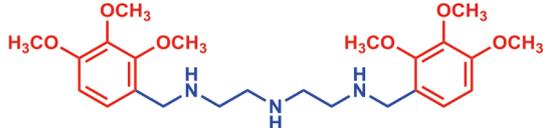
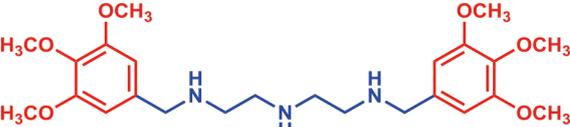
В таблице 1 представлены результаты определения антиаритмической активности исследуемых соединений на модели реперфузионных аритмий. В качестве препарата сравнения использовался верапамил (1 мг/кг, в/в), который также соответствует фармако-

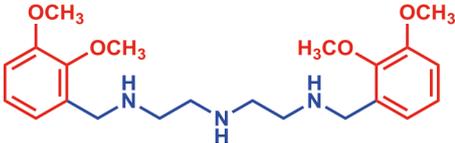
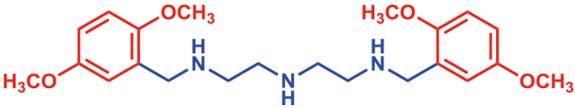
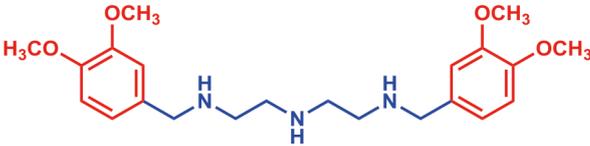
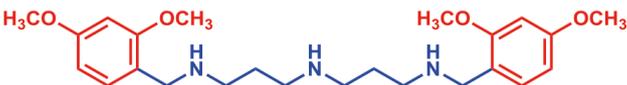
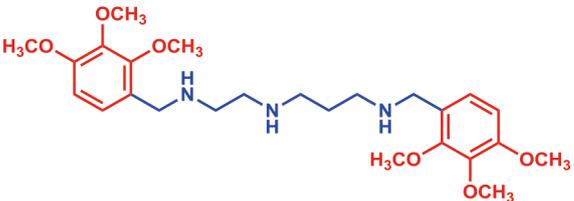
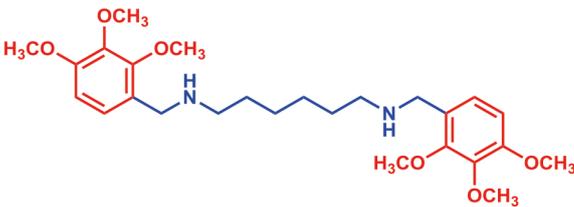
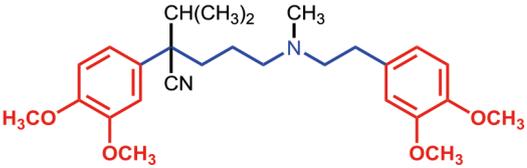
Таблица 1

Антиаритмическая активность соединений 1 и 2 на модели реперфузионных аритмий

Table 1

Antiarrhythmic activity of compounds 1 and 2 on a model of reperfusion arrhythmias

Шифр	Доза, мг/кг	Структура	Число животных с ЖТ и/или ФЖ / общее число животных в группе	
			Исследуемое соединение	Контроль
АЛМ-802	2		2/13 $p < 0,001$	10/10
АЛМ-803	1		6/7	10/11

Шифр	Доза, мг/кг	Структура	Число животных с ЖТ и/или ФЖ / общее число животных в группе	
			Исследуемое соединение	Контроль
АЛМ-815	2		8/13	10/10
АЛМ-821	2		5/12 $p = 0,022$	12/13
АЛМ-843	3		7/8	8/8
АЛМ-812	2		6/12	10/10
АЛМ-811	2		2/12 $p < 0,001$	12/13
АЛМ-844	1		6/8	8/8
АЛМ-845	2		8/8	8/8
Верапамил	1		3/8 $p = 0,0108$	12/12

форной модели биароматических кардиопротекторов (см. рис. 1).

Как следует из полученных данных, наиболее активными соединениями на модели реперфузионных аритмий оказались 2,3,4-триметоксизамещённые производные АЛМ-802 и АЛМ-811 с триазаалкановым линкером различной длины. В дозе 2 мг/кг эти вещества значимо ($p < 0,001$) препятствовали развитию желудочковых тахикардий и/или фибрилляций желудочков у 83–85 % животных, в то время как в контрольных группах эти нарушения фиксировались у 92–100 % крыс. Препарат сравнения верапамил на данной модели также проявлял антиаритмическую активность, предотвращая нарушения ритма у 63 % животных в дозе 1 мг/кг ($p = 0,0108$). Значимая активность ($p = 0,022$) была выявлена и у соединения АЛМ-821 (2 мг/кг) с 2,4-диметоксифенильными группами, а на уровне тенденции эффекты фиксировались у диметоксизамещённых веществ АЛМ-815 (2 мг/кг) и АЛМ-812 (2 мг/кг), которые препятствовали развитию желудочковых тахикардий и/или фибрилляций желудочков в 40–50 % случаях при 100 % нарушениях в контрольных группах.

Анализ связи «структура–антиаритмическая активность» на реперфузионной модели позволил выявить следующие закономерности (рис. 2):

1. Для наличия активности важным было наличие метокси-групп в орто-положениях ароматических колец молекул. При этом 2,3,4-триметокси-производные были активнее, чем различные диметоксизамещённые соединения.

2. Активными были только соединения, содержащие в азаалкановом линкере молекул центральный атом азота ($X = NH$). Его замена на углерод приводила к исчезновению антиаритмических свойств в реперфузионной модели.

3. Длина азаалканового линкера могла быть проварьирована в пределах 10–12 связей без существенного влияния на активность соединений.

Заключение / Conclusion

В результате анализа взаимосвязи «структура–антиаритмическая активность» бис-алкоксифенилтриазаалканов **1** и бис-алкоксифенилдиазаалканов **2** на модели реперфузионных аритмий у крыс установлено, что целевую активность соединений в условиях данной модели обеспечивает наличие 2,3,4-триметоксифенильных ароматических фармакофоров, а также присутствие центрального атома азота в линкере. Интересно отметить, что исчезновение целевой активности при переходе от бис-алкоксифенилтриазаалканов **1** к бис-алкоксифенилдиазаалканам **2**, например, от соединения АЛМ-802 к АЛМ-844, наблюдалось только в условиях модели реперфузионных аритмий, тогда как на всех других моделях аритмии и ишемии, использовавшихся ранее, замена центрального атома азота на атом углерода не влияла на биологическую активность изучаемых соединений.

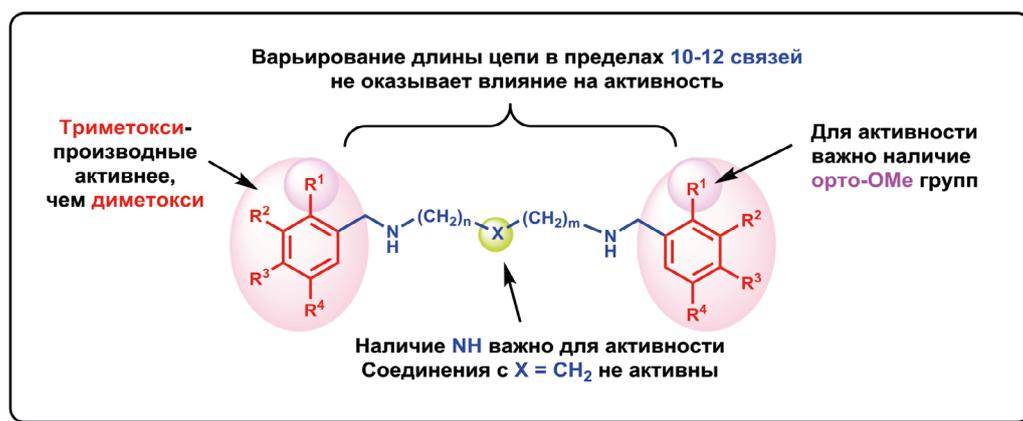


Рис. 2. Анализ связи «структура–активность» на модели реперфузионной аритмии у исследуемых соединений **1** и **2**

Fig. 2. Analysis of the «structure–activity» relationship on the model of reperfusion arrhythmia of the studied compounds **1** and **2**

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Барчуков Владимир Валерьевич

e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4229-3107>
 SPIN-код: 6743-4280

н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Vladimir V. Barchukov

e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4229-3107>
 SPIN code: 6743-4280

Research scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Столярук Валерий Николаевич

e-mail: vns@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>
 SPIN-код: 3405-8229

к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Valeriy N. Stolyaruk

e-mail: vns@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>
 SPIN code: 3405-8229

PhD, Cand. Sci. (Med.), Senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov institute of Pharmacology»

Цорин Иосиф Борисович

e-mail: tsorinib@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
 SPIN-код: 4015-3025

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

Iosif B. Tsorin

e-mail: tsorinib@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
 SPIN code: 4015-3025

Dr. Sci. (Biology), Leading researcher of laboratory of pharmacological screening, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Вититнова Марина Борисовна

e-mail: MB-Vit@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
 SPIN-код: 1901-8919

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

Marina B. Vititnova

e-mail: MB-Vit@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
 SPIN code: 1901-8919

PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Крыжановский Сергей Александрович

e-mail: SAK-538@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
 SPIN-код: 6596-4865

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

Sergey A. Kryzhanovskii

e-mail: SAK-538@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
 SPIN code: 6596-4865

Dr. Sci (Med.), Head of laboratory of pharmacological screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Воробьева Татьяна Юрьевна

e-mail: vorobjewa.tan2017@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-6710-3597>
 SPIN-код: 7892-5349

м. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Tatyana Yu. Vorobieva

e-mail: vorobjewa.tan2017@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-6710-3597>
 SPIN code: 7892-5349

Junior researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Бирюкова Валентина Евгеньевна
 e-mail: valentina.biryukova.e@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0000-9586-6971>
 м. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Valentina E. Biryukova
 e-mail: valentina.biryukova.e@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0000-9586-6971>
 Junior researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Мокров Григорий Владимирович
Автор, ответственный за переписку
 e-mail: g.mokrov@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>
 SPIN-код: 8755-7666
 к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Grigory V. Mokrov
Corresponding author
 e-mail: g.mokrov@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>
 SPIN code: 8755-7666
 PhD, Cand. Chemical Sci., Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 1. Блокаторы кальциевых каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(4):3–17. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 1. Calcium channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(4):3–17. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-4-3-17.
2. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 2. Блокаторы HCN-каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(2):03–10. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 2. HCN channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(2):03–10. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2022-2-03-10.
3. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 3. Блокаторы натриевых каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(3):3–9. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 3. Sodium channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(3):3–9. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2022-3-3-9.
4. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 4. Блокаторы и модуляторы калиевых hERG-каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(4):3–19. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 4. Potassium hERG channels blockers and modulators. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(4):3–19. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2022-4-3-19.
5. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 5. Блокаторы калиевых каналов Kv1.5. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023. (в печати). [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 5. Kv1.5 potassium channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023. (in press). (In Russ).].
6. Wiśniewska B, Mendyk A, Fijorek K, Glinka A, Polak S. Predictive model for L-type channel inhibition: multichannel block in QT prolongation risk assessment. *J Appl Toxicol*. 2012 Oct;32(10):858–66. DOI: 10.1002/jat.2784.
7. Мокров Г. В., Лихошерстов А. М., Барчуков В. В. и др. Синтез и кардиотропная активность линейных метоксифенилтриазаалканов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(6):16–23. [Mokrov GV, Likhosherstov AM, Barchukov VV, et al. Synthesis and cardiotropic activity of linear methoxyphenyl triazaalkanes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(6):16–23. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-6-16-23.
8. Мокров Г. В., Лихошерстов А. М., Барчуков В. В. и др. Синтез и кардиотропная активность 1-(метоксибензил)-4-[2-((метоксибензил)амино)этил]пиперазинов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(9):9–14. [Mokrov GV, Likhosherstov AM, Barchukov VV, et al. Synthesis and cardiotropic activity of 1-(methoxybenzyl)-4-[2-((methoxybenzyl)amino)ethyl]piperazines. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(9):9–14. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-9-9-14.
9. Мокров Г. В., Лихошерстов А. М., Барчуков В. В. и др. Синтез и кардиотропная активность циклических метоксифенилтриазаалканов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(7):7–12. [Mokrov GV, Likhosherstov AM, Barchukov VV, et al. Synthesis and cardiotropic activity of cyclic methoxyphenyl triazaalkanes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(7):7–12. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-7-7-12.
10. Мокров Г. В., Лихошерстов А. М., Барчукова Е. И. и др. Синтез и кардиотропная активность бис-(2,3,4-триметоксибензил)алкандиаминов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(4):19–24. [Mokrov GV, Likhosherstov AM, Barchukova EI, et al. Synthesis and cardiotropic activity of bis-(2,3,4-trimethoxybenzyl)alkanediamines. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55(4):19–24. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-4-19-24.
11. Цорин И. Б., Теплов И. Ю., Зинченко В. П. и др. Механизмы антиаритмического действия соединения АЛМ-802. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2022;174(8):179–183. [Tsorin IB, Teplov IYu, Zinchenko VP, et al. Mechanisms of the antiarrhythmic action of the compound ALM-802. *Bull Exp Biol Med*. 2022;174(8):179–183. (In Russ).]. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-8-179-183.
12. Кожевникова Л. М., Барчуков В. В., Семенова Н. П. и др. Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе кардиопротективного действия соединения АЛМ-802. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2020;170(9):301–305. [Kozhevnikova LM, Barchukov VV, Semenova NP, et al. Study of the molecular mechanisms underlying the cardioprotective action of the compound ALM-802. *Bull Exp Biol Med*. 2020;170(9):301–305. (In Russ).]. DOI: 10.47056/0365-9615-2020-170-9-301-305.
13. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Миронов А.Н. (ред.). М.: Гриф и К, 2013. С. 395 [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Mironov AN (ed.). Moscow: Grif and K, 2013. (In Russ).].
14. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68–78.
15. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013 Jan;123(1):92–100. DOI: 10.1172/JCI62874.

16. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B, Cascio WE. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS*. 1996;76:99–114. DOI: 10.1007/978-3-0348-8988-9_7.
17. Bond JM, Chacon E, Herman B, Lemasters JJ. Intracellular pH and Ca^{2+} homeostasis in the pH paradox of reperfusion injury to neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1993 Jul;265(1 Pt 1):C129–37. DOI: 10.1152/ajpcell.1993.265.1.C129.
18. Mattiazzi A, Argenziano M, Aguilar-Sanchez Y, Mazzocchi G, Escobar AL. Ca^{2+} Sparks and Ca^{2+} waves are the subcellular events underlying Ca^{2+} overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Feb;79:69–78. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.011.
19. Bagheri F, Khori V, Alizadeh AM, Khalighfard S, Khodayari S, Khodayari H. Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: Mechanisms and therapies. *Life Sci*. 2016 Nov 15;165:43–55. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.09.013.
20. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Oct;287(4):C817–33. DOI: 10.1152/ajpcell.00139.2004.
21. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014 Jul;94(3):909–50. DOI: 10.1152/physrev.00026.2013.
22. Ling H, Gray CB, Zambon AC, et al. Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II δ mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through nuclear factor- κB . *Circ Res*. 2013 Mar 15;112(6):935–44. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.276915.
23. Becerra R, Román B, Di Carlo MN, et al. Reversible redox modifications of ryanodine receptor ameliorate ventricular arrhythmias in the ischemic-reperfused heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Sep 1;311(3):H713–24. DOI: 10.1152/ajpheart.00142.2016.

Изучение базовых фармакокинетических свойств нового производного гистидин-содержащего дипептида карнозина — пирролилкарнозина

© *Абаимов Д. А.¹, Хуторова А. В.^{1,2}, Сариев А. К.³, Куликова О. И.¹, Белоусова М. А.², Стволинский С. Л.¹, Мигулин В. А.⁴, Фёдорова Т. Н.¹*

¹ — ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Российская Федерация

² — ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

³ — ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

⁴ — ФГБУН Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

Аннотация. В эксперименте на лабораторных крысах линии Wistar было проведено пилотное изучение фармакокинетических характеристик нового пиррольного производного карнозина — пирролилкарнозина. По итогам эксперимента рассчитаны базовые фармакокинетические параметры препарата. Изучено распределение препарата по тканям и органам. Показана тропность пирролилкарнозина к органам элиминации и способность пирролилкарнозина проникать в ткань сердечной мышцы.

Ключевые слова: пиррол; карнозин; пирролилкарнозин; фармакокинетика; тканевая доступность; распределение; хроматография; масс-спектрометрия

Для цитирования:

Абаимов Д. А., Хуторова А. В., Сариев А. К., Куликова О. И., Белоусова М. А., Стволинский С. Л., Мигулин В. А., Фёдорова Т. Н. Изучение базовых фармакокинетических свойств нового производного гистидин-содержащего дипептида карнозина — пирролилкарнозина. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(2):29–36. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-29-36>

Поступила: 21 апреля 2023 г. **Принята:** 22 апреля 2023 г. **Опубликована:** 30 июня 2023 г.

The pilot study of the basic pharmacokinetic properties of pyrrolylcarnosine — the new pyrrolic derivative of dipeptide carnosine

© Denis A. Abaimov¹, Anastasiya V. Khutorova^{1,2}, Abrek K. Sariev³, Olga I. Kulikova¹, Margarita A. Belousova², Sergey L. Stvolinsky¹, Vasily A. Migulin⁴, Tatiana N. Fedorova¹

¹ — Research Center of Neurology, Moscow, Russian Federation

² — Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

³ — FSAEI HE I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovskiy University), Moscow, Russian Federation

⁴ — N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. The experimental study of the pharmacokinetic characteristics of a new pyrrole derivative of carnosine, pyrrolylcarnosine, was carried out. Based on the results of the experiment, the basic pharmacokinetic parameters of the drug are expected. The tissues and organs bioavailability was studied. The tropism of pyrrolylcarnosine to the organs of elimination and the ability of pyrrolylcarnosine to penetrate into the heart muscle tissue were shown.

Keywords: pyrrole; carnosine; pyrrolylcarnosine; pharmacokinetics; tissue availability; distribution; chromatography; mass-spectrometry

For citations:

Abaimov DA, Khutorova AV, Sariev AK, Kulikova OI, Belousova MA, Stvolinsky SL, Migulin VA, Fedorova TN. The pilot study of the basic pharmacokinetic properties of pyrrolylcarnosine — the new pyrrolic derivative of dipeptide carnosine. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(2): 29–36. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-29-36>

Received: April 21, 2023. **Accepted:** April 22, 2023. **Published:** June 30, 2023.

Введение / Introduction

Создание новых эффективных препаратов, обладающих комбинированным действием, включающим антиоксидантные и противовоспалительные эффекты является актуальной задачей современной фармакологии. Можно полагать, что новое вещество, созданное на основе двух компонентов (карнозина и

пиррола), с учётом биологических свойств веществ-прекурсоров, может стать новым перспективным соединением. Цитопротекторная эффективность гистидин-содержащего дипептида карнозина, обусловленная его широким спектром биологического действия, включая антиоксидантное, представлена в различных экспериментальных моделях паркинсонизма и ишемии головного мозга, а также в пилотных

клинико-биохимических исследования [1, 2]. Однако значимым фактором, лимитирующим внедрение карнозина в клиническую медицину в виде лекарственной формы, является его быстрый гидролиз в кровяном русле под действием специфического фермента — сывороточной карнозины. Производные другого компонента нового соединения — пиррола (ароматического пятичленного азотистого гетероцикла) уже нашли весьма широкое применение при синтезе терапевтически активных соединений, включая фунгициды, антибиотики, противоопухолевые средства, нестероидные противовоспалительные препараты [3–5]. В российской неврологической и психиатрической практике, например, достаточно широко применяется пиррол-содержащий препарат из группы рацетамов — пирацетам, характеризующийся нейротропным и нейропротективным действием и входящий в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов РФ [6]. В последнее время была разработана новая серия аналогов пиррола на основе пиррол-2,5-диона, большинство из которых продемонстрировали значительную антиоксидантную активность [7]. В последнее время был синтезирован также ряд новых гидразонов N-пирролилгидразида, характеризующихся прямой антиоксидантной активностью в клеточных моделях оксидативного стресса [8]. Таким образом, благодаря имеющимся данным о биологических эффектах пиррола и карнозина, представляется перспективным создание нового конъюгата, характеризующегося высокой антиоксидантной активностью и устойчивостью к гидролизу сывороточной карнозиной.

В Научном центре неврологии, в сотрудничестве с коллегами из Института органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН, было разработано новое соединение на основе пирролидина и карнозина. По исследованным физико-химическим характеристикам синтезированный 3-(N-пирролил)пропаноил-L-гистидин (пирролилкарнозин) описывается структурной формулой, подтвержденной данными исследования продукта реакции методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения (рис. 1).

Молекулярная масса пирролилкарнозина, определенная методом масс-спектрометрии высокого разрешения, составила 276 г/моль.

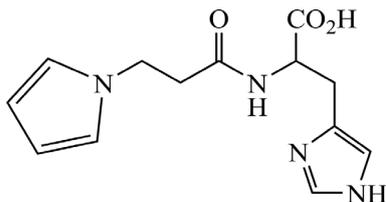


Рис. 1. Структурная формула пирролилкарнозина
Fig. 1. Structural formula of pyrrolylcarnosine

В отличие от карнозина, пирролилкарнозин характеризуется высокой устойчивостью к гидролизу сывороточной карнозиной (патент RU 2777391) [9], определяемой по методу *A. Pegova H, et al.* (2000) [10].

Одним из важнейших доклинических испытаний новых лекарственных веществ является изучение их фармакокинетических свойств, позволяющее оценить всасывание, распределение, метаболизм и выведение. Изучение процессов распределения позволяет выявить органы и ткани, в которые они проникают наиболее интенсивно и/или в которых удерживаются наиболее длительно, что может способствовать более детальному изучению механизмов действия лекарственных веществ [11–13].

Целью данного исследования явилось изучение распределения в организме и тканевой биодоступности нового конъюгата карнозина и пиррола — пирролилкарнозина, потенциально обладающего антиоксидантными и антигипоксантами свойствами.

Материалы и методы / Materials and methods

Эксперименты выполнены на 50 крысах-самцах линии Вистар с массой тела 180–220 г, которые содержались в условиях вивария на стандартной диете с соблюдением всех правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.).

Распределение пирролилкарнозина в организме крыс изучали в органах потенциального действия — сердце и мозге, а также в органах, обеспечивающих элиминацию — печени и почках. Пирролилкарнозин вводили крысам внутривенно в терапевтической дозе 200 мг/кг. Пробоотбор производился в следующие дискретные интервалы времени: 15, 30, 60, 120 и 240 минут после введения ($n = 6$). Для оценки эффективности проникновения препарата в изучаемые ткани использовался такой фармакокинетический параметр, как показатель тканевой доступности f_T , определяемый отношением значения площади под фармакокинетической кривой AUC в ткани изучаемого органа к соответствующей величине AUC в плазме крови.

Для количественного определения пирролилкарнозина в биологических образцах нами был разработан авторский хроматомасс-спектрометрический метод (ВЭЖХ-МС). Извлечение пирролилкарнозина из биологического материала осуществляли методом депротенинизации. К образцу плазмы крови или образцу гомогената ткани органов (1:2, м:ч, ткань: бидистиллят) объемом 100 мкл добавляли 400 мкл раствора внутреннего стандарта (L-аланил-карнозин, 10 мкг/мл) в 10 % трихлоруксусной кислоте с целью преципитации протеинов плазмы. Образовавшуюся взвесь денатурированных белков осаждали на ультрацентрифуге на скорости 16000 г. Надосадочную жидкость осторожно декантировали и переносили в хроматографическую

виалу, которую помещали в автосамплер хроматографа для дальнейшего хромато-масс-спектрометрического анализа. Супернатант инжестировали в петлю хроматографа в объёме 10 мкл.

Концентрацию пирролилкарнозина в тканях органов и плазме крыс определяли методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии на приборе Finnigan Surveyor LC Pump Plus в сочетании с масс-спектрометрическим детектором «LCQ Fleet MS» (квадрупольная ионная ловушка). Для хроматографического разделения применяли аналитическую колонку Ultrasphere 5 ODS фирмы Nichrom Ltd., Великобритания (250 × 4,6 мм; 5 мкм). Подвижная фаза состояла из двух растворов: 10 мМ ацетат аммония, подкисленный ледяной уксусной кислотой до pH 3,7 (раствор А) и ацетонитрил — 10 мМ ацетат аммония (90:10) (раствор Б), взятых в соотношении 90 %А: 10 %Б, работа проводилась в изократическом режиме элюирования. Скорость потока подвижной фазы 0,7 мл/мин. Объём пробы — 10 мкл. Температура разделения 35°. Продолжительность хроматографирования — 10 минут (рис. 2).

Время удерживания пирролилкарнозина — 8,22±0,05 мин. Время удерживания внутреннего стандарта (L-аланил-карнозина, Ltd Hamari Chemicals) — 5,80±0,05 мин. Детектирование: масс-

спектрометрическое, по дочерним ионам с m/z 156,02; 231,10; 258,98; образующимся в результате распада молекулярного иона пирролилкарнозина с m/z 277,29 при нормализованной энергии соударений 35 eV (масс-спектр второго порядка для пирролилкарнозина представлен на рис. 3). Внутренний стандарт (L-аланил-карнозин) детектировали по суммарному ионному току дочерних ионов в диапазоне m/z 75 — 300, образующимся в результате распада молекулярного иона L-аланил-карнозина с m/z 298,3. Масс-спектрометр работал в режиме регистрации ионов, положительно заряженных электроспреем (ESI), создаваемым напряжением в 5 кВ. Скорость потока газа-небулайзера (азота) — 5 л/мин, давление на распылителе — 100 psi. Температура интерфейса капилляра составляла 350 °С, температура нагревателя — 300 °С. Амплитуда возбуждения на концевых электродах ловушки 0,1 В. В качестве демпфирующего газа в ионной ловушке использовался гелий. Данные обрабатывались с помощью Xcalibur 2.1 w/Foundation 1.0.1.

Для количественного определения концентрации пирролилкарнозина применяли метод внутреннего стандарта. При градуировке измеряли отношение площадей хроматографических пиков целевого вещества и внутреннего стандарта в зависимости от concentra-

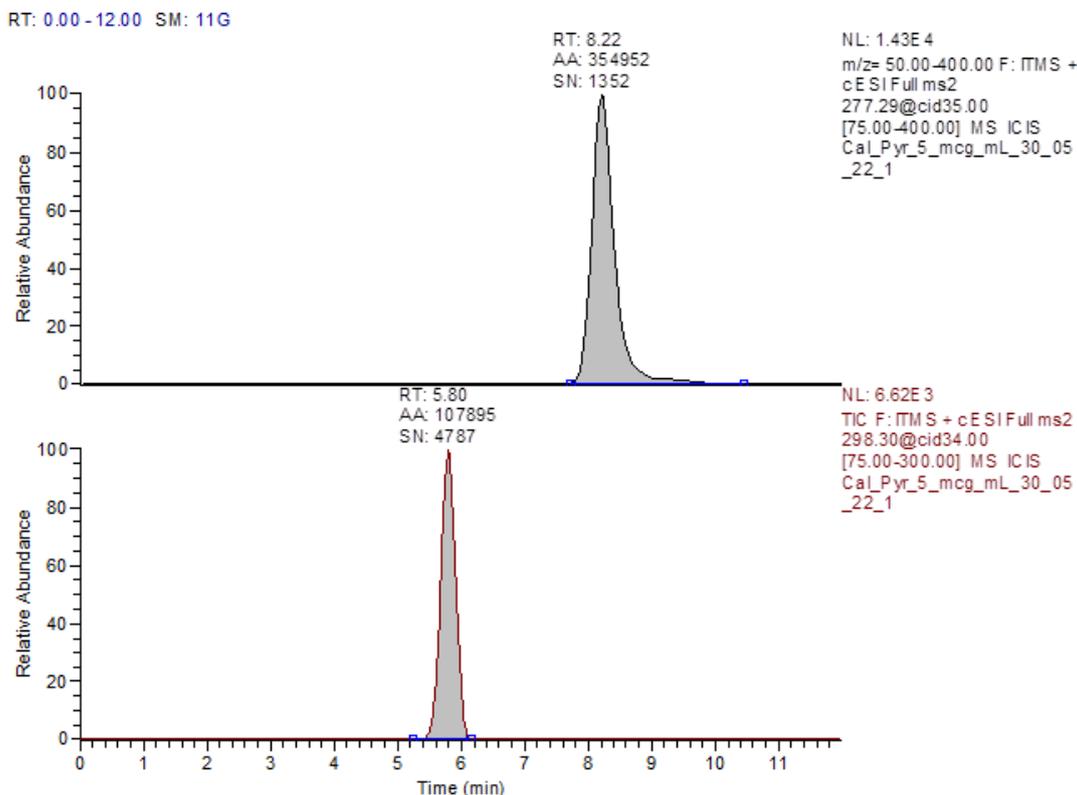
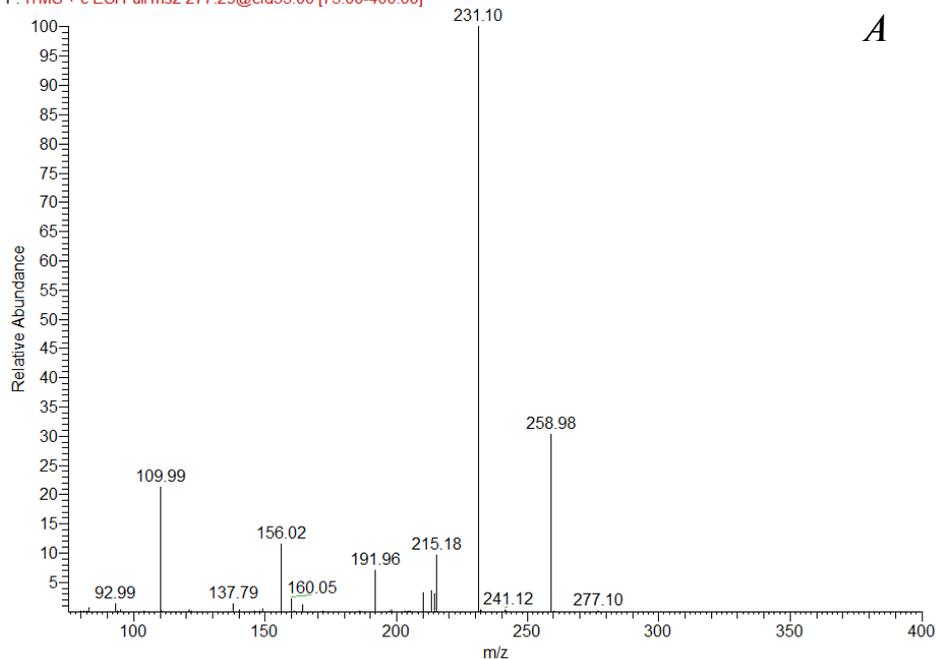


Рис. 2. Демонстрационная хроматограмма стандартного образца пирролилкарнозина с концентрацией 5 мкг/мл

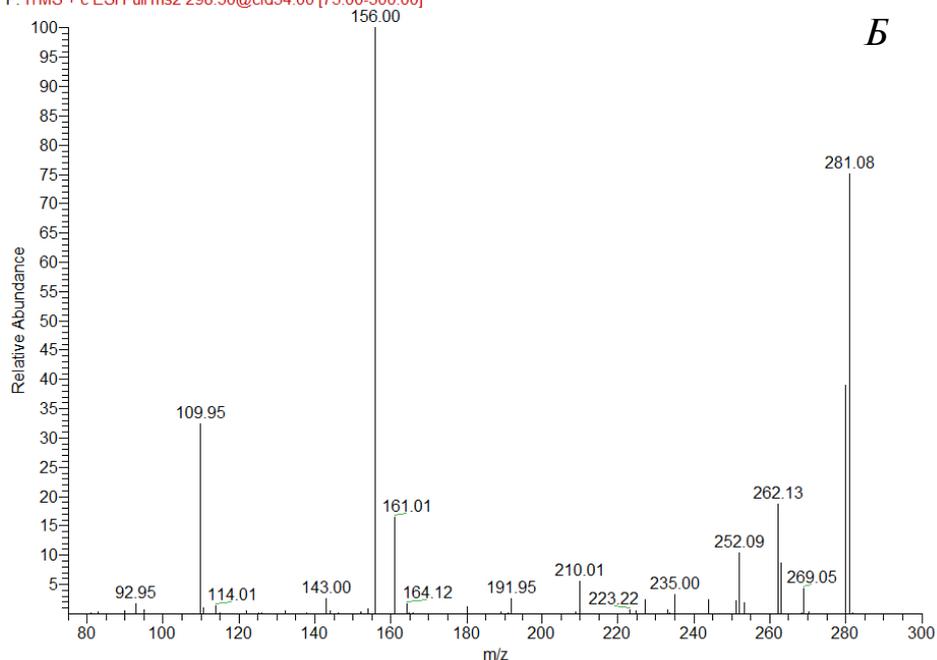
Fig. 2. Demonstrative chromatogram of a standard sample of pyrrolylcarnosine with concentration of 5 µg/ml

test_1_220208235129 #1263-1307 RT: 8.04-8.29 AV: 6 NL: 1.24E3
 F: ITMS + c ESI Full ms2 277.29@cid35.00 [75.00-400.00]



A

test_1_220208235129 #824-853 RT: 5.27-5.42 AV: 4 NL: 7.37E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 298.30@cid34.00 [75.00-300.00]



B

Рис. 3. Масс-спектры второго порядка для пирролилкарнозина (*A*) и аланил-карнозина (*B*)

Fig. 3. MS² mass-spectra for pyrrolylcarnosine (*A*) and alanyl-carnosine (*B*)

Таблица 1

Фармакокинетические параметры соединения пирролилкарнозин в плазме крови крыс при внутривенном введении в дозе 200 мг/кг

Table 1

Pharmacokinetic parameters of pyrrolylcarnosine in the rat plasma after administration in dose 200 mg/kg, i.v.

Параметры	C ₀ (мкг/мл)	C _{max} (мкг/мл)	AUC (мкг/мл·ч)	K _{el} (ч ⁻¹)	T _{1/2} (ч)	MRT (ч)	Cl (мл/(ч·кг))	Vss (мл/кг)
Значения	567,4	377,3	493,74	1,23	0,562	0,988	437,35	352,7

ции пирролилкарнозина. Для обчёта использовалась линейная регрессия, на основе метода наименьших квадратов. Градуировочная зависимость была линейной в диапазоне концентраций от 0,5 мкг/мл до 10 000 мкг/мл. Концентрацию пирролилкарнозина определяли по формуле:

$$C = 0,7481 \times S,$$

где C — концентрация пирролилкарнозина, выраженная в нг/мл; S — площадь хроматографического пика пирролилкарнозина, нормированная на площадь внутреннего стандарта. Относительная ошибка методики определения пирролилкарнозина не превышала 10 %.

Расчёты основных фармакокинетических параметров производили немодельным методом с помощью валидированной фармакокинетической программы Phoenix WinNonlin 8.3 (США), статистическую обработку осуществляли в программе Excel.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

В результате проведённого исследования были получены фармакокинетические кривые концентрации пирролилкарнозина в плазме крови, сердце, печени и почках экспериментальных животных через 15, 30, 60, 120 и 240 минут после его внутривенного введения в дозе 200 мг/кг.

Максимальная концентрация пирролилкарнозина в плазме крови наблюдается на пятнадцатой минуте после введения (377,3 мкг/мл). Затем происходит немонокотонное снижение концентрации с биэкспо-

ненциальным характером, что указывает на наличие быстрой первой фазы элиминации, которая сменяется более медленной фазой выведения. За два часа после введения концентрация пирролилкарнозина в крови крыс плавно снижается до концентрации 111,3 мкг/мл, т. е. чуть более чем в три раза. Это характеризует пирролилкарнозин как вещество, достаточно долго циркулирующее в плазме крови. В пользу этого также свидетельствуют основные рассчитанные фармакокинетические характеристики пирролилкарнозина представленные в табл. 1, в частности на это указывают высокие значения периода полуэлиминации (T_{1/2el} = 0,56 часа) и среднего времени удерживания (MRT = 0,989 часа). Медленное снижение концентрации пирролилкарнозина в крови предопределяет большую величину площади под фармакокинетической кривой (AUC = 493,74 мкг × ч/мл). Величина кажущегося объёма распределения (Vss) равна 390 мл/кг, что сопоставимо с объёмом экстрацеллюлярной жидкости в организме крысы [14]. Это свидетельствует о низкой способности пирролилкарнозина накапливаться в тканях. С этим же, по-видимому, связано невысокое значение показателя системного клиренса (Cl = 400 мл/час × кг), несмотря на выраженность процессов элиминации соединения.

В сердце целевое соединение обнаруживается в максимальной концентрации (52,16 мкг/г) через 15 минут после введения, а затем быстро, более чем четырёхкратно, снижается к 30 минутам, определяясь до 4 часов (табл. 2). Фармакокинетический профиль (см. рис. 4) пирролилкарнозина в ткани сердца близок

Таблица 2

Фармакокинетические параметры распределения пирролилкарнозина в органах и тканях после его болюсного внутривенного введения в дозе 200 мг/кг

Table 2

Pharmacokinetic parameters of the pyrrolylcarnosine tissue distribution after its bolus intravenous administration at a dose of 200 mg/kg

Биоматериалы	ФК параметры и размерность						
	T _{max} (ч)	AUC _{0-t} (ч·мкг/мл/гр)	AUC _{0-∞} (ч·мкг/мл/гр)	MRT (ч)	T _{1/2el} (ч)	f _{t от 0-t}	f _{t от 0-∞}
Плазма крови	0,25	493,74	495,87	0,989	0,56	—	—
Сердце	0,25	38,54	48,89	2,47	1,73	0,09	0,11
Почки	0,25	3180,54	5103,96	2,02	1,32	7,52	11,99
Печень	0,5	1214,5	2051,05	2,18	1,42	2,87	4,82
Мозг	—	—	—	—	—	—	—

f_{t от 0-t} или от 0-∞ — тканевая доступность, рассчитывается по формуле: f_t = AUC_t / AUC_p, где AUC_t — AUC в ткани; AUC_p — AUC в плазме крови — см.

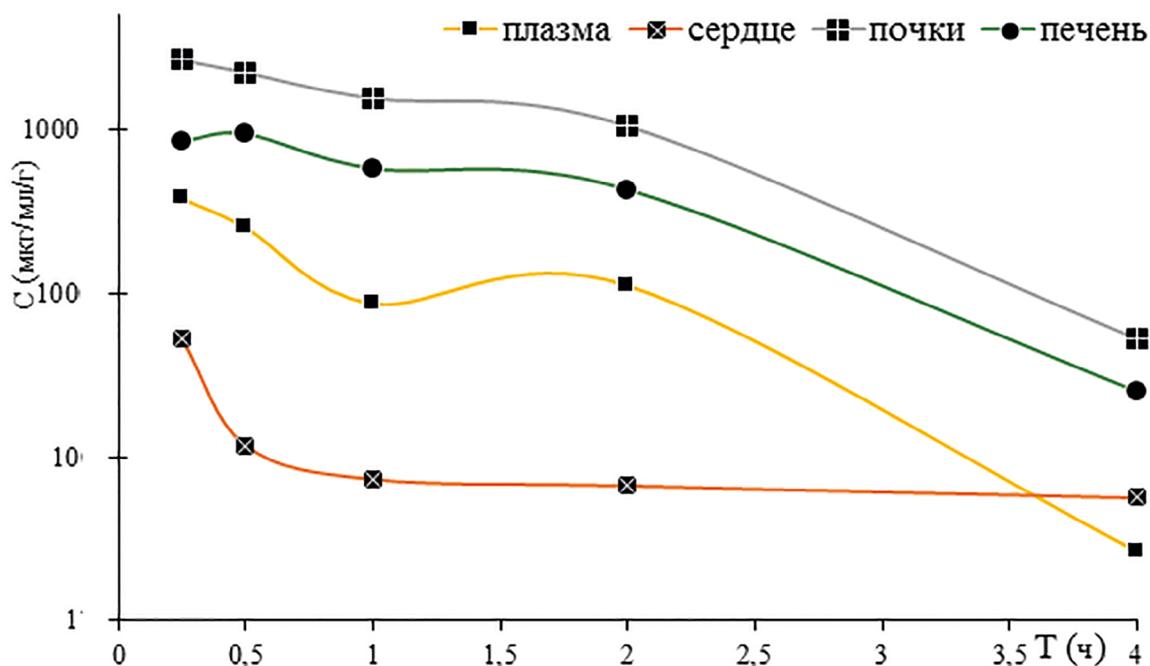


Рис. 4. Усреднённые фармакокинетические графики элиминации пирролилкарнозина из различных органов (полулогарифмические кривые) ($n = 6$)

Fig. 4. Averaged pharmacokinetic curves for the elimination of pyrrolylcarnosine from various organs (semilogarithmic curves) ($n = 6$)

к таковому для плазмы крови. Тканевая доступность пирролилкарнозина для сердечной мышцы не высока и составляет приблизительно около 9 % от его содержания в кровотоке (табл. 2).

Тканевая доступность пирролилкарнозина для органов элиминации, напротив, очень высока и составляет 2,87 для печени и 7,52 для почек (см. табл. 2), что свидетельствует о тропности в отношении почечного пути выведения из организма. Снижение количества вещества в печени и почках происходит аналогично таковому в плазме крови (рис. 4).

Следует отметить, что в перфузированном головном мозге пирролилкарнозин не обнаруживался, что свидетельствует о его неспособности преодолевать гематоэнцефалический барьер у здоровых животных.

Заключение / Conclusion

Разработана методика хроматомасс-спектрометрического количественного определения нового пиррольного производного дипептида карнозина — пирролилкарнозина. В результате проведённых исследований нами показано, что распределение пирролилкарнозина по органам носит неоднородный характер. Наибольшую тропность пирролилкарнозин проявляет в отношении органов элиминации. Из органов элиминации наибольшая тканевая доступность продемонстрирована для тканей почек. Максимальное абсолютное содержание пирролилкарнозина отмечается в почках, наименьшее в ткани сердечной мышцы. В ткани перфузированного мозга пирролилкарнозин не обнаруживается, что свидетельствует об отсутствии проникновения данного вещества через интактный гематоэнцефалический барьер.

ролилкарнозина по органам носит неоднородный характер. Наибольшую тропность пирролилкарнозин проявляет в отношении органов элиминации. Из органов элиминации наибольшая тканевая доступность продемонстрирована для тканей почек. Максимальное абсолютное содержание пирролилкарнозина отмечается в почках, наименьшее в ткани сердечной мышцы. В ткани перфузированного мозга пирролилкарнозин не обнаруживается, что свидетельствует об отсутствии проникновения данного вещества через интактный гематоэнцефалический барьер.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

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., старший научный сотрудник лаборатории гемореологии, гемостаза и фармакокинетики с клинической и лабораторной диагностикой ФГБНУ НЦН, Москва, Российская Федерация

Denis A. Abaimov

Corresponding author

e-mail: abaidenis@yandex.ru

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

SPIN code: 7548-0933

PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher at the Laboratory of Hemorheology, Hemostasis and Pharmacokinetics with clinical and laboratory diagnostics, Res Ctr Neurol (RCN), Moscow, Russian Federation

Хуторова Анастасия Викторовна

e-mail: hutotova.anastasiya@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-6682-0287>

лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной и трансляционной нейрхимии ФГБНУ НЦН, Москва, Российская Федерация; аспирант кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Anastasiya V. Hutotova

e-mail: hutotova.anastasiya@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-6682-0287>

laboratory assistant-researcher of the Laboratory of Experimental and Translational Neurochemistry Res Ctr Neurol (RCN), Moscow, Russian Federation; postgraduate student of the Department of Pharmacology of the Faculty of Fundamental Medicine Lomonosov MSU, Moscow, Russian Federation

Сариев Абрек Куангалиевич

e-mail: danisarov@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1603-067X>

SPIN-код: 3945-1271

д. м. н., профессор, в. н. с. лаборатория фармакокинетики и метаболомного анализа ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Abrek K. Sariev

e-mail: danisarov@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1603-067X>

SPIN code: 3945-1271

Dr. Sci (Med.), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Pharmacokinetics and Metabolomic Analysis FSAEI HE I. M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russian Federation

Куликова Ольга Игоревна

e-mail: posibilidad@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1129-6033>

SPIN-код: 3421-5893

к. б. н., н. с. лаборатории экспериментальной и трансляционной нейрхимии ФГБНУ НЦН, Москва, Российская Федерация

Olga I. Kulikova

e-mail: posibilidad@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1129-6033>

SPIN code: 3421-5893

PhD, Cand. Sci. (Biology), Researcher at the Laboratory of Experimental and Translational Neurochemistry Res Ctr Neurol (RCN), Moscow, Russian Federation

Белоусова Маргарита Алексеевна

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1144-6804>

SPIN-код: 8483-4288

к. м. н., н. с. кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Margarita A. Belousova

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1144-6804>

SPIN code: 8483-4288

PhD, Cand. Sci. (Med), Researcher of the Department of Pharmacology of the Faculty of Fundamental Medicine Lomonosov MSU, Moscow, Russian Federation

Стволинский Сергей Львович

e-mail: slstvolinsky@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4690-2440>
SPIN-код: 9615-5446

д. б. н., в. н. с. лаборатории экспериментальной и трансляционной нейрохимии ФГБНУ НЦН, Москва, Российская Федерация

Мигулин Василий Андреевич

e-mail: vmiguli@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8815-6939>
к. х. н., н. с. лаборатории гетероциклических соединений ИОХ РАН им. Н.Д. Зелинского, Москва, Российская Федерация

Федорова Татьяна Николаевна

e-mail: tnf51@bk.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0483-1640>
SPIN-код: 4658-2381

д. б. н., г. н. с., заведующая лабораторией экспериментальной и трансляционной нейрохимии ФГБНУ НЦН, Москва, Российская Федерация

Sergey L. Stvolinsky

e-mail: slstvolinsky@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4690-2440>
SPIN code: 9615-5446

Dr. Sci (Biology), Leading Researcher at the Laboratory of Experimental and Translational Neurochemistry Res Ctr Neurol (RCN), Moscow, Russian Federation

Vasily A. Migulin

e-mail: vmiguli@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8815-6939>
PhD, Cand. Chemical Sci., Researcher at the Laboratory of Heterocyclic Compounds ZIOC RAS, Moscow, Russian Federation

Tatiana N. Fedorova.

e-mail: tnf51@bk.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0483-1640>
SPIN code: 4658-2381

Dr. Sci (Biology), Chief Researcher, Head of the Laboratory of Experimental and Translational Neurochemistry Res Ctr Neurol (RCN), Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

- Berezhnoy DS, Stvolinsky SL, Lopachev AV, et al. Carnosine as an effective neuroprotector in brain pathology and potential neuromodulator in normal conditions. *Amino Acids*. 2019 Jan;51(1):139–150. DOI: 10.1007/s00726-018-2667-7.
- Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*. 2013 Oct;93(4):1803–45. DOI: 10.1152/physrev.00039.2012.
- Bhardwaj V, Gumber D, Abbot V, Dhiman S, Sharma P. Pyrrole: a resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics. *Rsc Advances*. 2015;5(20):15233–15266. DOI:10.1039/C4RA15710A
- Каратеев А. Е. На пути к созданию новой генерации нестероидных противовоспалительных препаратов: амтолметин гуацил. *Современная ревматология*. 2014;(2):72–78. [Karateev AE. On the way toward designing next-generation nonsteroidal anti-inflammatory drugs: amtolmetin guacil. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology Journal*. 2014;(2):72–78. (In Russ).]. doi: 10.14412/1996-7012-2014-2-83-89.
- Матвеев А.В., Крашенинников А.Е., Егорова Е.А. Современный взгляд на эффективность и безопасность кеторолака. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2018;(4):34–39. [Matveev AV, Krasheninnikov AE, Egorova EA. Modern view on the efficacy and safety of ketorolac. *RMJ. Medical Review*. 2018;(4):34–39. (In Russ).].
- Солгалова А.С., Солдагов В.О., Першина М.А., Покровская Т.Г. Пирацетам и бетагистин: возможные механизмы эндотелиопротекции. *Человек и его здоровье*. 2018;(2):61–69. [Solgalova AS, Soldatov VO, Pershina MA, Pokrovskaya TG. Piracetam and betahistine: possible mechanisms of endothelioprotection. *Humans and their health*. 2018;(2):61–69. (In Russ).]. DOI: 10.21626/vestnik/2018-2/10.
- Hanuman Reddy V, Mallikarjuna Reddy G, Thirupalu Reddy M, Rami Reddy YV. Microwave-assisted facile synthesis of trisubstituted pyrrole derivatives. *Research on Chemical Intermediates*. 2015;41:9805–9815. DOI: 10.1007/s11164-015-1966-9.
- Tzankova D, Vladimirova S, Peikova L, Georgieva M. Synthesis of pyrrole and substituted pyrroles. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 2018;53(3):451–464. DOI: 10.2478/acph-2020-0026.

- Патент 2 777 391 C1 Российская Федерация, МПК C07D403/12 A61K31/4178 A61P39/06 A61P25/00. Средство, обладающее антиоксидантной и нейропротекторной активностью. Заявитель и патентообладатель ФГБНУ НЦН. – № 2021133431; заявл. 17.11.2021; опубл. 03.08.2022; Бюл.№23. [Fedorova TN, Stvolinsky SL, Migulin VA, et al, inventors; SUBSTANCE WITH ANTIOXIDANT AND NEUROPROTECTOR ACTIVITY. Russia patent RU 2777391 C1., 2022. (In Russ).]. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2777391C1>
- Pegova A, Abe H, Boldyrev A. Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2000 Dec;127(4):443–6. DOI: 10.1016/s0305-0491(00)00279-0.
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р. У. Хабриева. 2-изд., перераб. и доп. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. 832 с. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. Under the general editorship of corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Professor RU Khabriev. 2nd ed., reprint. and additional. Moscow: JSC "Publishing House "Medicine", 2005. (In Russ).].
- Основы фармакокинетики / И.И. Мирошниченко. Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2002 (ООО Момент) 185 с. [Miroshnichenko II. Osnovy farmakokinetiki. GEOTAR-Media, 2002. (In Russ).].
- Фармакокинетика / Н.Н. Каркищенко, В.В. Хоронько, С.А. Сергеева, В.Н. Каркищенко; Под ред. Г.И. Должич. Ростов-на-Дону: Феникс, 2001. 381 с. [Farmakokinetika. Karkishchenko NN, Khoronko VV, Sergeeva SA, Karkishchenko VN. / Ed by Dolzhich GI. Rostov-on-Don: Phoenix; 2001. (In Russ).].
- Тюренок И.Н., Перфилова В.Н., Смирнова Л.А., и др. Фармакокинетические свойства нового производного ГАМК цитрокарда: распределение и тканевая биодоступность. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2012;(2):26–29. [Tyurenkov IN, Perfilova VN, Smirnova LA, et al. Pharmacokinetic properties of a new GABA citrocard derivative: distribution and tissue bioavailability. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2012;(2):26-29. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2013-76-3-38-40.

Изучение влияния приёма пищи на биодоступность, безопасность и переносимость лекарственного препарата Атериксен®, таблетки, 100 мг у здоровых добровольцев

Василюк В. Б.¹, Джурко Ю. А.², Глобенко А. А.³, Шитов Л. Н.², Шабров В. Н.², Пасько М. А.³, Ковчан О. В.³, Капашин А. В.³, Башкатова А. И.³

¹ — ООО «Научно-исследовательский центр «ЭкоБезопасность», Санкт-Петербург, Российская Федерация

² — ООО «КАЯР», Ярославль, Российская Федерация

³ — АО «Валента Фарм», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Цель исследования. Первичной целью исследования являлась оценка влияния приёма пищи на биодоступность лекарственного препарата Атериксен®, таблетки, 100 мг после его однократного приёма натощак и после еды. Дополнительная цель заключалась в оценке фармакокинетических параметров, безопасности и переносимости препарата Атериксен® при его однократном приёме в дозе 100 мг натощак и после приёма пищи. **Материал и методы.** В исследование включали здоровых добровольцев мужского и женского пола в возрасте от 18 до 45 лет. В связи с отсутствием данных о внутрииндивидуальной вариабельности основных фармакокинетических параметров действующего вещества препарата Атериксен® (XC221GI, 1-[2-(1-Метилимидазол-4-ил)-этил]пергидроазин-2,6-дион) в исследовании применялся адаптивный последовательный подход. На Этапе I было рандомизировано 24 добровольца (по 12 в каждой группе): группа 1 (последовательность ААВ) принимала терапию А (приём препарата натощак) в периоде I, терапию А в периоде II и терапию В (приём препарата после еды) в периоде III, группа 2 (последовательность ВВА) принимала терапию В в периоде I, терапию В в периоде II и терапию А в периоде III. В каждом периоде исследования у добровольцев отбирали образцы крови до и в течение 12 ч после приёма препарата исследования. Количественное определение действующего вещества XC221GI в образцах плазмы крови проводилось валидированным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Безопасность препарата оценивали по количеству и степени тяжести нежелательных явлений (НЯ) и серьёзных нежелательных явлений (СНЯ), зарегистрированных на основании жалоб, данных физикального осмотра, а также по изменениям лабораторных показателей и электрокардиографического исследования (ЭКГ). Переносимость исследуемого препарата оценивали по доле добровольцев, досрочно прекративших участие в исследовании из-за возникновения НЯ/СНЯ. **Результаты исследования.** 24 рандомизированных добровольца завершили исследование полностью в соответствии с одобренным протоколом исследования. Усреднённые профили фармакокинетических кривых XC221GI при приёме исследуемого препарата натощак и после приёма пищи имели близкие формы. Доверительные интервалы для отношений средних геометрических значений первичных показателей ($AUC_{(0-t)}$ и C_{max}) XC221GI, а также $AUC_{(0-\infty)}$ соответствовали пределам эквивалентности 80,00–125,00 %, при этом было отмечено небольшое по абсолютной величине, но статистически значимое различие по времени достижения максимальной концентрации исследуемого вещества. На протяжении исследования у 2 добровольцев при приёме препарата после приёма пищи отмечались НЯ в виде снижения количества эритроцитов, концентрации гемоглобина и значения гематокрита. Все зарегистрированные НЯ имели лёгкую степень тяжести. Связь НЯ с исследуемым препаратом по оценке врача-исследователя была расценена как сомнительная. **Заключение.** Результаты исследования показали отсутствие влияния фактора приёма пищи на биодоступность лекарственного препарата Атериксен®, таблетки, 100 мг, а также его безопасность и хорошую переносимость при однократном приёме здоровыми добровольцами в дозе 100 мг.

Ключевые слова: биодоступность; Атериксен; приём пищи; фармакокинетика; безопасность; переносимость; перекрёстное исследование; здоровые добровольцы

Для цитирования:

Василюк В. Б., Джурко Ю. А., Глобенко А. А., Шитов Л. Н., Шабров В. Н., Пасько М. А., Ковчан О. В., Капашин А. В., Башкатова А. И. Изучение влияния приёма пищи на биодоступность, безопасность и переносимость лекарственного препарата Атериксен®, таблетки, 100 мг у здоровых добровольцев. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(2):37–44. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-37-44>

Поступила: 04 мая 2023 г. **Принята:** 04 мая 2023 г. **Опубликована:** 30 июня 2023 г.

Study of the effect of food on the bioavailability, safety and tolerability of Aterixen® 100 mg tablet in healthy volunteers

Vasily B. Vasilyuk¹, Yuri A. Dzhurko², Alexander A. Globenko³, Leonid N. Schitov², Vitaly N. Shabrov², Maxim A. Pasko³, Olga V. Kovchan³, Anzhelika I. Bashkatova³

¹ — Scientific Research Center Eco-Safety LLC, St. Petersburg, Russian Federation

² — KAYAR LLC, Yaroslavl, Russian Federation

³ — Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim. The primary objective of the study was to evaluate the effect of food on the bioavailability of Aterixen® 100 mg tablet after single oral dose under fasting or fed conditions. The secondary objective was to evaluate the pharmacokinetic parameters, safety, and tolerability of Aterixen® 100 mg tablet after single oral dose under fasting or fed conditions. **Materials and methods.** Healthy male and female volunteers aged 18 to 45 years were included in the study. Due to lack of data about intra-individual variability of the main pharmacokinetic parameters of the active substance in Aterixen® (XC221GI, 1-[2-(1-Methylimidazol-4-yl)-ethyl]perhydroazin-2,6-dione), an adaptive group sequential approach was used in the study. At Stage I, 24 volunteers were randomized into 2 groups (12 in each group): Group 1 (sequence AAB) received treatment A (administration of the drug under fasting conditions) during period I, treatment A during period II and treatment B (administration of the drug under fed conditions) during period III, Group 2 (sequence BBA) received therapy B during period I, therapy B during period II, and therapy A during period III. In each study period, serial blood samples were collected before and throughout 12 h after administration of the study drug. The quantification of the active substance XC221GI in plasma samples was performed using a validated high-performance liquid chromatography method with mass spectrometric detection. Safety evaluation was performed on the basis of frequency and severity of adverse events (AEs) and serious adverse events (SAEs), which were registered based on complaints, physical examination, laboratory tests, and electrocardiography (ECG). Drug tolerability was evaluated in terms of proportion of volunteers who prematurely discontinued participation in the study

due to AE/SAE. **Results.** 24 randomized volunteers completed the study in compliance with the approved study protocol. The averaged pharmacokinetic curves profiles of XC221GI had similar shapes under fasting and fed conditions. Confidence intervals for the ratio of the geometric means for the primary parameters ($AUC_{(0-t)}$ and C_{max}) of XC221GI and $AUC_{(0-\infty)}$ were within the 80-125 % acceptance interval, while a small in absolute value, but statistically significant differences were noted in time until C_{max} is reached. Throughout the study, 2 volunteers reported AEs (low RBC count, low hemoglobin concentration, and low hematocrit value) after receiving the study drug under fed conditions. All reported AEs were mild. The relationship between AEs and the study drug product was assessed by investigator as doubtful. **Conclusion.** The results of this study indicate that food does not affect the bioavailability of Aterixen® 100 mg, tablets, and the single oral dose of 100 mg was safe and well tolerated by healthy volunteers.

Keywords: bioavailability; Aterixen; food effect; pharmacokinetics; safety; tolerability; crossover study; healthy volunteers

For citations:

Vasilyuk VB, Dzhurko YuA, Globenko AA, Shitov LN, Shabrov VN, Pasko MA, Kovchan OV, Kapashin AV, Bashkatova AI. Study of the effect of food on the bioavailability, safety and tolerability of Aterixen® 100 mg tablet in healthy volunteer. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2023;(2):37–44. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-37-44>

Received: May 4, 2023. **Accepted:** May 4, 2023. **Published:** June 30, 2023.

Введение / Introduction

С декабря 2019 года вспышка новой коронавирусной инфекции, вызывающая обширные поражения лёгочной ткани с большим количеством осложнений, среди которых наблюдался тяжёлый острый респираторный синдром (ТОРС), начала распространяться по всему миру. В марте 2020 г. Всемирная Организация Здравоохранения объявила, что распространение коронавирусной инфекции приобрело характер пандемии. За прошедшее время крупнейшими фармацевтическими компаниями и научными институтами были разработаны вакцины, внедрены высокочувствительные тест-системы, а также разработаны новые лекарственные препараты для лечения коронавирусной инфекции. Несмотря на значительные успехи в лечении тяжёлых форм заболевания, отмечается появление новых штаммов коронавируса, характеризующихся повышенной контагиозностью с преобладанием лёгкого и среднетяжёлого течения. К последним можно отнести штамм Омикрон, инкубационный период которого составляет от 2 до 7 суток (в среднем 3–4 суток), что значительно превосходит показатели ранее выявляемых штаммов [1–3].

Лёгкая форма коронавирусной болезни наиболее часто встречается среди лиц молодого и среднего возраста. Для данных пациентов характерна высокая мобильность, что способствует активному распространению заболевания в популяции. Симптомы лёгкой формы коронавирусной болезни носят неспецифический характер и, часто протекая под видом ОРВИ, проявляются в виде повышения температуры тела до субфебрильных значений (< 38 °C), появления кашля, слабости и боли в горле. Большинство пациентов с лёгкой формой коронавирусной инфекции не имеют хронических заболеваний и относятся к социально-активной части населения, что важно учитывать для раннего выявления и локализации заболевания [3, 4].

Препарат Атериксен® представляет собой оригинальный лекарственный препарат, обладающий противовоспалительной активностью. В доклинических исследованиях *in vitro* и *in vivo* было показано снижение выработки провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, а также хемокинов IP-10 (CXCL10) и MIG (CXCL9), являющихся медиаторами острой фазы

воспаления, лихорадки и «цитокинового шторма» [5]. В клиническом исследовании III фазы препарат продемонстрировал свою эффективность при лечении лёгких форм коронавирусной болезни, достоверно снижая частоту перехода к среднетяжёлому течению [6].

Материалы и методы / Materials and methods

Было проведено открытое рандомизированное перекрёстное исследование с 2 видами терапии (натощак и после еды), 3 периодами, 2 последовательностями и адаптивным, двухэтапным дизайном для оценки влияния приёма пищи на биодоступность препарата Атериксен®, таблетки, 100 мг при однократном приёме здоровыми добровольцами (идентификатор на портале clinicaltrials.gov — NCT05295121) [7]. Исследование было начато после получения Разрешения на проведение клинического исследования Министерства здравоохранения РФ (№ 889 от 23.12.2021 г.) и одобрения Совета по этике при Министерстве здравоохранения РФ (Выписка из протокола № 290 от 26 октября 2021 г.), а также одобрения Независимого (локального) этического комитета исследовательского центра (Выписка № 5 из протокола заседания № 223 от 03 февраля 2022 года).

Все добровольцы, принявшие участие в исследовании, соответствовали критериям включения: лица мужского и женского пола в возрасте от 18 до 45 лет (включительно) с индексом массы тела (ИМТ) в пределах $18,5 \leq \text{ИМТ} \leq 30 \text{ кг/м}^2$ при массе тела не менее 45 кг и не более 100 кг; наличие подписанного согласия добровольца на участие в исследовании; верифицированный диагноз «здоров»; согласие добровольца (в т. ч. партнерши) на использование адекватных методов контрацепции в течение исследования и 3 недель после его завершения; жизненно важные показатели в пределах нормы.

К основным критериям невключения относились: повышенная чувствительность к действующему веществу препарата Атериксен® (XC221GI, 1-[2-(1-Метилимидазол-4-ил)-этил]пергидроазин-2,6-дион) и/или любому другому компоненту исследуемого препарата; отягощённый аллергологический анамнез; наличие в анамнезе бронхиальной астмы, рецидивирующего полипоза носа или околоносовых

пазух, аллергического ринита; наследственная непереносимость лактозы, дефицит лактазы и синдром мальабсорбции глюкозы—галактозы; хронические заболевания; острые инфекционные заболевания в течение 30 дней до начала исследования; хирургические вмешательства на желудочно-кишечном тракте в анамнезе (за исключением аппендэктомии); приём любых лекарственных препаратов в течение 14 дней до скрининга; приём лекарственных препаратов, оказывающих выраженное влияние на гемодинамику или функцию печени менее чем за 30 дней до скрининга; значения жизненно важных и лабораторных показателей, выходящие за пределы референтных интервалов; приём более 10 ед. алкоголя в неделю; курение более 10 сигарет в день и неспособность воздержаться от курения за 48 ч до начала исследования и в ходе пребывания в стационаре; особая диета, употребление алкоголя, кофеина и ксантинсодержащих продуктов за 72 ч до приёма исследуемого препарата, употребление цитрусовых, клюквы и продуктов их содержащих, препаратов или продуктов с содержанием зверобоя — за 7 дней до приёма исследуемого препарата; беременность, период грудного вскармливания, положительный тест мочи на беременность (для женщин с сохранённым репродуктивным потенциалом); использование добровольцем-женщиной гормональных контрацептивов в течение 2 мес. до приёма исследуемого препарата и др.

Критериями исключения являлись: отзыв добровольцем согласия на участие в исследовании; СНЯ, независимо от причинно-следственной связи с приёмом препарата; любое другое НЯ, если исследователь считал, что в интересах добровольца прекратить участие в исследовании; пропуск двух подряд или четырёх и более отборов крови для определения фармакокинетических параметров в течение одного периода исследования фармакокинетики; нарушение требований протокола исследования; необходимость проведения лечения, которое может повлиять на фармакокинетические параметры исследуемого препарата; рвота и/или диарея у добровольца в течение 24 ч до приёма исследуемого препарата или в течение 3 ч после приёма исследуемого препарата и др.

Схема дизайна исследования приведена на рис. 1.

В связи с отсутствием данных по внутрииндивидуальной вариабельности основных фармакокинетических параметров препарата Атериксен[®], в данном исследовании применялся адаптивный последовательный подход (модифицированный по *Molins E et al.* (2017) метод Potvin тип C) [8, 9].

На этапе I было рандомизировано 24 добровольца, которые были распределены по 12 человек в каждую последовательность приёма: добровольцы из группы 1 (последовательность ААВ) принимали терапию А (приём натощак) в периоде I и II, а терапию В (приём после еды) — в периоде III, добровольцы из группы 2 (последовательность ВВА) принимали терапию В в периодах I и II, терапию А — в периоде III.

Рацион стандартизованного завтрака, в соответствии с руководством Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) «Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies» [10], включал повышенное содержание жиров, с общей калорийностью 800–1000 ккал (жиров 500–600 ккал, белков 150 ккал, углеводов 250 ккал).

В каждом периоде исследования у добровольцев проводился отбор 16 образцов крови по 6 мл: до приёма исследуемого препарата, через 10 мин, 20 мин, 30 мин, 40 мин, 50 мин, 1 ч, 1 ч 15 мин, 1 ч 30 мин, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч после приёма исследуемого препарата. Таким образом, было обеспечено более 3 точек отбора проб на фазе абсорбции и не менее 5 на фазе элиминации действующего вещества. Общая продолжительность наблюдения за концентрацией ХС221GI в организме добровольцев составила 12 ч (более 4 периодов полувыведения) [11, 12].

Количественное определение действующего вещества препарата Атериксен[®] — ХС221GI (1-[2-(1-Метилимидазол-4-ил)-этил]пергидроазин-2,6-дион) в образцах плазмы крови проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Методика была валидирована по следующим характеристикам: селективность и специфичность, перенос пробы, нижний предел количественного определения, калибровочная кривая, точность, прецизионность, линейность отклика, эффект матрицы, стабильность. Методика валидирована в диапазоне концентраций 1,00–400,00 нг/мл.

На основании полученных результатов измерения концентрации действующего вещества ХС221GI в плазме крови добровольцев определяли и/или вычисляли следующие фармакокинетические показатели: максимальная концентрация в плазме (C_{max}); время достижения максимальной концентрации (t_{max}); площадь под фармакокинетической кривой «плазменная концентрация — время» от начального момента времени до последней определяемой концентрации во временной точке t ($AUC_{(0-t)}$); площадь под фармакокинетической кривой «плазменная концентрация — время» от начального момента времени до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$); период полувыведения ($t_{1/2}$); среднее время удержания препарата в плазме (MRT); константа скорости элиминации (K_{el}); кажущийся объём распределения (V_d); отношение максимальной концентрации к площади под кривой «плазменная концентрация — время» за время наблюдения ($C_{max}/AUC_{(0-t)}$); отношение площади под кривой «плазменная концентрация — время» за время наблюдения к расчётной площади под кривой «плазменная концентрация — время» от нуля до бесконечности ($AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$); f' — относительная биодоступность ($AUC_{(0-t)(fed)}/AUC_{(0-t)(fasting)}$); f'' — относительная скорость абсорбции ($C_{max(fed)}/C_{max(fasting)}$).

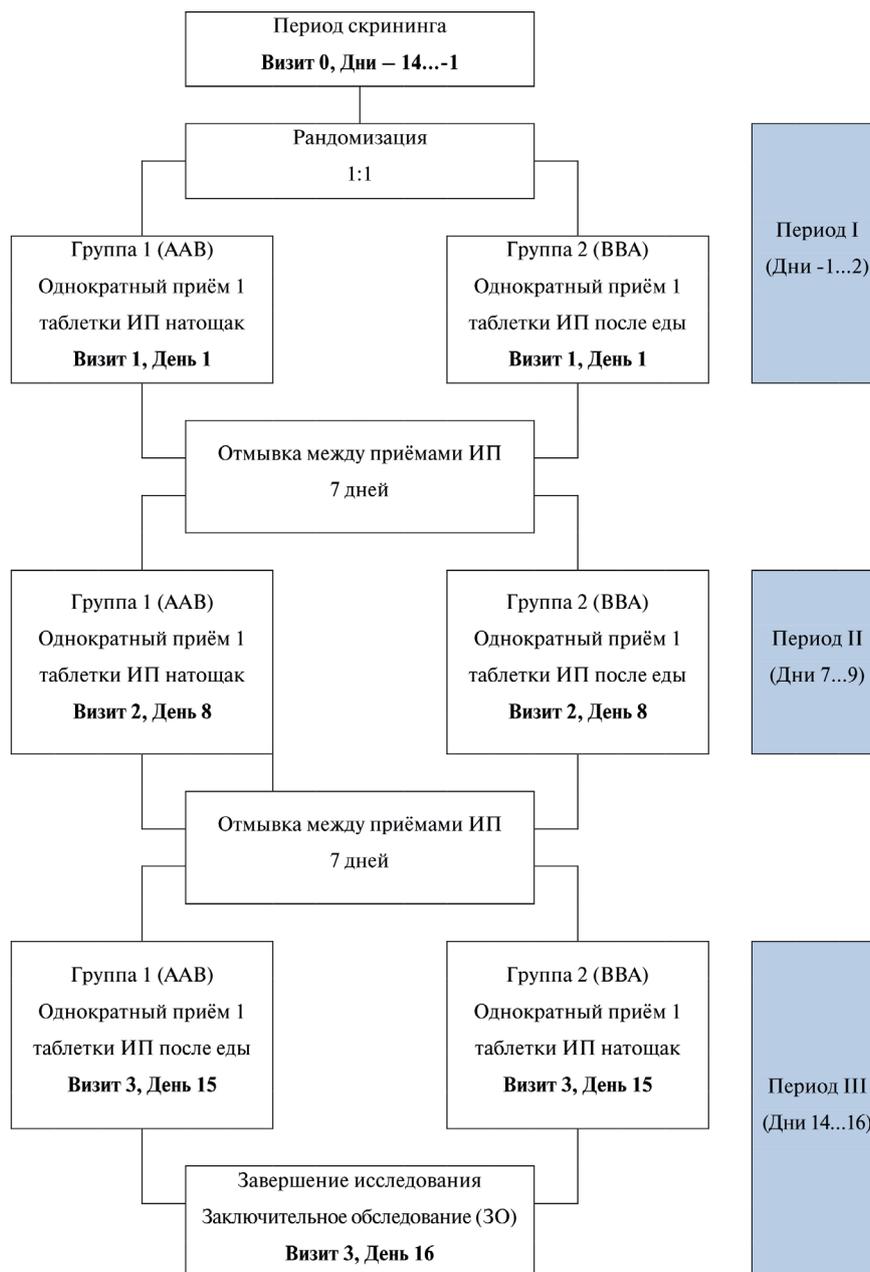


Рис. 1. Схема дизайна исследования

Fig. 1. Study design diagram

Примечания: А — приём препарата натощак; В — приём препарата после еды; ИП — исследуемый препарат.

Notes: A — drug administration under fasting conditions; B — drug administration under fed conditions; ИП — study drug.

Для расчётов всех вышеуказанных параметров использовалось фактическое время получения образцов. Вывод о влиянии приёма пищи на биодоступность исследуемого препарата основывался на показателях C_{max} , $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$. Остальные фармакокинетические параметры приведены в описательном виде, без дополнительной интерпретации. Для оценки влияния приёма пищи на биодоступность использовался метод, основанный на расчёте двусторонних доверительных

интервалов (ДИ) для отношения средних геометрических значений анализируемых параметров (C_{max} , $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$) препарата Атериксен® при приёме натощак (терапия А, fasting) и после еды (терапия В, fed). В соответствии с руководством FDA [10], вывод об отсутствии влияния приёма пищи на биодоступность препарата Атериксен® делали, если 90 % ДИ для отношения fed/fasting геометрических средних значений $AUC_{(0-t)}$ и C_{max} находился в пределах 80–125 %.

Безопасность сравниваемых препаратов оценивали по следующим параметрам: нежелательные явления (НЯ) и серьёзные нежелательные явления (СНЯ); изменения данных осмотров и исследований (физикальный осмотр, основные жизненно важные показатели, лабораторные и инструментальные исследования). Переносимость оценивали по доле добровольцев, досрочно прекративших участие в исследовании из-за возникновения НЯ/СНЯ.

Статистический анализ проводился в предположении о логнормальном распределении параметров AUC и C_{max} и нормальном распределении остальных параметров за исключением t_{max} . В предположении о логнормальном распределении сравнение средних значений параметров для fed (терапия В, приём после еды) и fasting (терапия А, приём натощак) проводилось на основе мультипликативной модели, а ДИ построены для отношений соответствующих средних значений. После проведения логарифмического преобразования эти показатели анализировались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA; параметрический метод).

Статистическая модель дисперсионного анализа включала следующие факторы, вносящие вклад в наблюдаемую вариацию данных. При проведении анализа после этапа I оценивалась последовательность + период + препарат + субъект (последовательность). Дисперсионный анализ использовался для проверки гипотез о статистической значимости вклада каждого из указанных факторов в наблюдаемую вариативность. Полученная с помощью дисперсионного анализа оценка остаточной вариации применялась при расчёте ДИ для отношения средних значений основных фармакокинетических параметров. Статистический анализ параметра t_{max} выполнен с по-

мощью непараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) (критерий Манна–Уитни).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Все рандомизированные добровольцы завершили исследование полностью в соответствии с утверждённым протоколом исследования.

После получения фармакокинетических данных на первом этапе был проведён промежуточный анализ данных, по результатам которого необходимость в проведении второго этапа была признана нецелесообразной.

Усреднённые профили фармакокинетических кривых XC221GI при приёме исследуемого препарата натощак и после приёма пищи имели близкие формы (рис. 2).

Средние значения основных и дополнительных фармакокинетических параметров XC221GI после приёма исследуемого препарата натощак и после еды представлены в табл. 1.

Доверительные интервалы для отношений средних геометрических значений (натощак и после приёма пищи) $AUC_{(0-t)}$, C_{max} и $AUC_{(0-\infty)}$ для XC221GI составили 93,8–113,83; 83,09–109,53 и 93,72–113,69, соответственно. Все показатели для действующего вещества соответствовали пределам эквивалентности 80,00–125,00 %.

Необходимо однако отметить небольшое по абсолютной величине, но статистически значимое различие по времени достижения максимальной концентрации исследуемого вещества, свидетельствующее о способности пищи незначительно замедлять всасывание препарата. При выполнении дисперсионного анализа фармакокинетического параметра $AUC_{(0-\infty)}$, $AUC_{(0-t)}$ и C_{max} (логарифмически преобразованные данные)

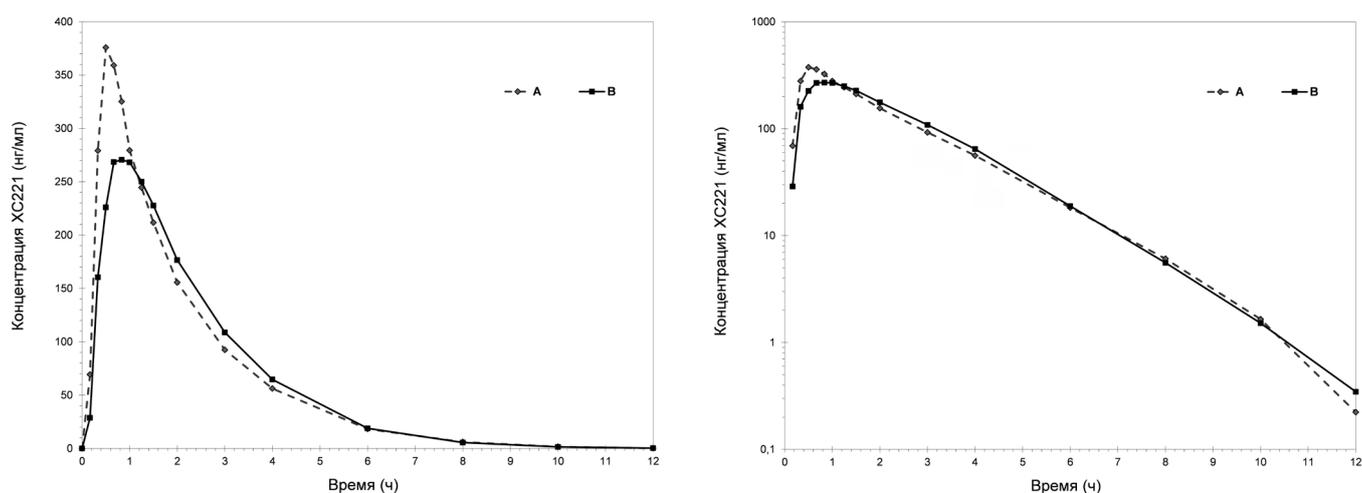


Рис. 2. Усреднённые (среднее по варианту приёма) фармакокинетические профили концентраций XC221GI в плазме крови добровольцев при приёме исследуемого препарата натощак (А) и после еды (В) в линейных координатах (слева) и в полулогарифмических координатах (справа)

Fig. 2. Averaged pharmacokinetic profiles of XC221GI concentrations in the blood plasma of volunteers after an oral dose of the study drug under fasting (A) or fed conditions (B) in linear coordinates (left) and in semi-logarithmic coordinates (right)

Таблица 1

Фармакокинетические параметры XC221GI после приёма исследуемого препарата в дозе 100 мг натощак и после еды

Table 1

Pharmacokinetic parameters of XC221GI after a 100-mg oral dose under fasting or fed conditions

Фармакокинетический параметр	Приём натощак		Приём после еды	
	M	SD	M	SD
C_{max} , нг/мл	408,98	258,13	350,41	210,78
t_{max} , ч	0,61	0,27	0,94	0,53
$AUC_{(0-t)}$, нг×ч/мл	776,95	439,47	751,37	448,38
$AUC_{(0-\infty)}$, нг×ч/мл	780,56	440,00	754,89	449,57
$AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$, %	99,41	0,40	99,48	0,30
$C_{max}/AUC_{(0-t)}$, ч ⁻¹	0,5260	0,1237	0,4806	0,1200
$K_{el} (\lambda z)$, ч ⁻¹	0,59296	0,06054	0,63434	0,08695
$t_{1/2}$, ч	1,18	0,13	1,11	0,17
MRT, ч	2,06	0,29	2,22	0,17
V_d , л	294,88	180,11	266,05	123,35

Примечания: M — среднее арифметическое значение; SD — средне-квадратическое отклонение; C_{max} — максимальная концентрация в плазме; t_{max} — время достижения максимальной концентрации; $AUC_{(0-t)}$ — площадь под фармакокинетической кривой «плазменная концентрация — время» от начального момента времени до последней определяемой концентрации во временной точке t; $AUC_{(0-\infty)}$ — площадь под фармакокинетической кривой «плазменная концентрация — время» от начального момента времени до бесконечности; $AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$ — отношение площади под кривой «плазменная концентрация — время» за время наблюдения к расчётной площади под кривой «плазменная концентрация — время» от нуля до бесконечности; $C_{max}/AUC_{(0-t)}$ — отношение максимальной концентрации к площади под кривой «плазменная концентрация — время» за время наблюдения; $t_{1/2}$ — период полувыведения; MRT — среднее время удержания препарата в плазме; K_{el} — константа скорости элиминации (λz); V_d — кажущийся объём распределения.

Notes: M — arithmetic mean; SD — standard deviation; C_{max} — maximum plasma concentration; t_{max} — time until C_{max} is reached; $AUC_{(0-t)}$ — area under the plasma concentration curve from administration to last observed concentration at time t; $AUC_{(0-\infty)}$ — area under the plasma concentration curve extrapolated to infinite time; $AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$ — the ratio of the area under the plasma concentration-time curve during the observation time to the calculated area under the plasma concentration extrapolated to infinite time; $C_{max}/AUC_{(0-t)}$ — the ratio of the maximum concentration to the area under the plasma concentration-time curve during the observation period; $t_{1/2}$ — plasma concentration half-life; MRT — mean residence time; K_{el} — elimination rate constant (λz); V_d — apparent volume of distribution.

было установлено, что для исследуемого вещества единственным фактором, вносящим значимый вклад в наблюдаемую вариабельность данных, являлись «Испытуемые» ($p < 0,001$); вклад остальных факторов являлся статистически незначимым.

На протяжении всего исследования у 2 добровольцев после приёма пищи были зарегистрированы НЯ, их частота составила 8,33 % (2/24). В клиническом анализе крови обоих добровольцев определялось снижение показателя гематокрита и концентрации

гемоглобина, также было зафиксировано снижение числа эритроцитов у одного (4,17 %) из добровольцев. Не наблюдалось отклонений от нормы по результатам физикального осмотра, при оценке основных жизненно важных показателей, биохимического анализа крови, общего анализа мочи и ЭКГ. После перорального приёма исследуемого препарата натощак НЯ не регистрировалось. Все выявленные НЯ имели лёгкую степень тяжести. С учётом того, что каждый доброволец за всё время исследования при сдаче образцов потерял около 330 мл крови, связь выявленных НЯ с исследуемым препаратом, по мнению главного исследователя, была расценена как сомнительная. СНЯ в ходе проведения исследования и после его завершения не отмечалось. Все рандомизированные добровольцы завершили исследование полностью в соответствии с утверждённым протоколом исследования, что свидетельствует о хорошей переносимости препарата.

Обсуждение / Discussion

Известно, что приём пищи может оказывать влияние на биодоступность, безопасность и эффективность лекарственных препаратов. Помимо фармакодинамического взаимодействия пищи и лекарственного препарата, ярким примером которого может служить тираминовый («сырный») синдром, возможны фармакокинетические взаимодействия за счёт ингибирования системы цитохромов, а также конкурентное взаимодействие молекул на уровне мембранных и/или плазменных белков-переносчиков. Помимо этого, приём пищи может уменьшать эффективную площадь всасывания, изменять pH в просвете желудка и/или двенадцатиперстной кишке, влиять на растворимость лекарственного препарата, тем самым ускоряя либо замедляя его абсорбцию [13]. При выборе режима дозирования и обоснования его безопасности оценка влияния приёма пищи имеет первостепенное значение. Проведённое исследование показало отсутствие влияния фактора приёма пищи на биодоступность препарата Атериксен®, таблетки, 100 мг, а также хорошую переносимость и безопасность исследуемого препарата при однократном приёме в дозе 100 мг.

Заключение / Conclusion

В ходе исследования была проведена оценка фармакокинетических параметров лекарственного препарата Атериксен®, таблетки, 100 мг после его однократного приёма натощак и после приёма пищи. Так как 90 % ДИ для отношений средних геометрических значений $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$ и C_{max} соответствовали пределам эквивалентности 80,00–125,00 %, был сделан вывод о том, что фактор приёма пищи не влияет на экспозицию препарата. В ходе исследования препарат хорошо переносился, все добровольцы завершили исследование согласно протоколу. У двух добровольцев

были зарегистрированы НЯ лёгкой степени тяжести, их связь с приёмом препарата была расценена как сомнительная.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ
ADDITIONAL INFORMATION**

Участие авторов. Глобенко А. А., Капашин А. В. — концепция и дизайн исследования; Василюк В. Б.,

Джурко Ю. А., Шитов Л. Н., Шабров В. Н. — сбор и статистическая обработка данных; Пасько М. А., Капашин А. В. — написание текста; Ковчан О. В., Башкатова А. И. — редактирование.

Participation of authors. Globenko AA, Kapashin AV — study concept and design; Vasilyuk VB, Dzhurko YuA, Shitov LN, Shabrov VN — data collection and statistical processing; Pasko MA, Kapashin AV — writing the manuscript; Kovchan OV, Bashkatova AI — editing.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Василюк Василий Богданович

e-mail: vasilyuk_vb@ecosafety.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2503-4402>
SPIN-код: 1459-5548
Управляющий ООО «Научно-исследовательский центр Эко-безопасность», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Vasily B. Vasilyuk

e-mail: vasilyuk_vb@ecosafety.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2503-4402>
SPIN code: 1459-5548
Manager, Scientific Research Center Eco-Safety LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Джурко Юрий Александрович

e-mail: y.dzhurko@qayar.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5901-8120>
Заведующий биоаналитической лабораторией ООО «КАЯР», Ярославль, Российская Федерация

Yuri A. Dzhurko

e-mail: y.dzhurko@qayar.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5901-8120>
Head of the Bioanalytical Laboratory, KAYAR LLC, Yaroslavl, Russian Federation

Глобенко Александр Александрович

e-mail: Aleksandr.Globenko@valentapharm.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>
SPIN-код: 8135-0575
Руководитель медицинского управления АО «Валента Фарм», Москва, Российская Федерация

Alexander A. Globenko

e-mail: Aleksandr.Globenko@valentapharm.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>
SPIN code: 8135-0575
Head of the Medical Department, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Шитов Леонид Николаевич

e-mail: l.schitov@qayar.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3210-4264>
Ведущий специалист по фармакокинетике ООО «КАЯР», Ярославль, Российская Федерация

Leonid N. Schitov

e-mail: l.schitov@qayar.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3210-4264>
Leading specialist in pharmacokinetics, KAYAR LLC, Yaroslavl, Russian Federation

Шабров Виталий Николаевич

e-mail: v.shabrov@qayar.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0002-7614-5057>
Старший аналитик ООО «КАЯР», Ярославль, Российская Федерация

Vitaly N. Shabrov

e-mail: v.shabrov@qayar.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0002-7614-5057>
Senior Analyst, KAYAR LLC, Yaroslavl, Russian Federation

Пасько Максим Андреевич

Автор, ответственный за переписку
e-mail: Maksim.Pasko@valentapharm.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8518-3736>
Специалист группы разработки и анализа документов клинических исследований и регистрационных досье АО «Валента Фарм», Москва, Российская Федерация

Maxim A. Pasko

Corresponding author
e-mail: Maksim.Pasko@valentapharm.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8518-3736>
Specialist of the group for development and analysis of the clinical trial documents and registration dossiers Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Ковчан Ольга Валентиновна

e-mail: Olga.Kovchan@valentapharm.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0439-9402>
 Менеджер группы разработки и анализа документов клинических исследований и регистрационных досье АО «Валента Фарм», Москва, Российская Федерация

Капашин Алексей Валерьевич

e-mail: Aleksey.kapashin@valentapharm.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9437-0322>
 Руководитель группы разработки и анализа документов клинических исследований и регистрационных досье АО «Валента Фарм», Москва, Российская Федерация

Башкатова Анжелика Игоревна

e-mail: Anzhelika.Cherenkova@valentapharm.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0490-474X>
 Менеджер группы клинических исследований АО «Валента Фарм», Москва, Российская Федерация

Olga V. Kovchan

e-mail: Olga.Kovchan@valentapharm.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0439-9402>
 Manager of the group for development and analysis of the clinical trial documents and registration dossiers, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Aleksey V. Kapashin

e-mail: Aleksey.kapashin@valentapharm.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9437-0322>
 Head of the group for development and analysis of the clinical trial documents and registration dossiers, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Anzhelika I. Bashkatova

e-mail: Anzhelika.Cherenkova@valentapharm.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0490-474X>
 Clinical Research Group Manager, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Сорокина Е.С., Яхиббаева Д.Р. Статистика коронавируса в РФ за 2020–2021. *Международная научно-практическая конференция*. 2022;132–137. [Sorokina ES, Yakhibbaeva DR. Statistics of coronaviruses of the Russian Federation for 2020–2021. *International scientific conference*. 2022;132–137. (In Russ).]
2. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. 2023. Доступно на <https://files.covid19treatmentguidelines.nih.gov/guidelines/covid19treatmentguidelines.pdf>
3. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). МЗ РФ. Версия 17 (14.12.2022). [Vremennye metodicheskie rekomendacii. Profilaktika, diagnostika i lechenie novoy koronavirusnoj infekcii (COVID-19). MZ RF. Versiya 17 (14.12.2022). (In Russ).]
4. Денисенко А.С., Рисс М.Е., Никитина Н.Н., Кропачев И.Г. Особенности клиники и течения легкой формы коронавирусной инфекции. *Вестник НовГУ. Сер.: Медицинские науки*. 2022;127(2):94–97. [Denisenko AS, Riss ME, Nikitina NN, Kropachev IG. Features of the clinic and the course of mild coronaviral infection. *Vestnik NovSU. Issue: Medical Sciences*. 2022;127(2):94–97. (In Russ).]. DOI: 10.34680/2076-8052.2022.2(127).94–97.
5. ИМП. Препарат Атериксен. РУ № ЛП-007921. Дата регистрации 28.02.2022. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=da6eb5f5-e350-446e-80a5-2ab44916fa9b.
6. Отчёт о клиническом исследовании «Многоцентровое, адаптивное, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование по оценке эффективности и безопасности препарата ХС221, таблетки, 100 мг у пациентов с COVID 19 лёгкого течения». Москва: 2022. [Otchet o klinicheskom issledovanii «Mnogocentrovое, adaptivное, randomizirovannое, dvoynое slepое, placebo-kontroliruemое issledovanie po ocenke effektivnosti i bezopasnosti preparata ХС221, tabletki, 100 mg u pacientov s COVID 19 legkogo techeniya». Moscow: 2022. (In Russ).].

7. Отчёт о клиническом исследовании «Открытое рандомизированное перекрестное исследование с 2 видами терапии (натошак и после еды), 3 периодами, 2 последовательностями и адаптивным, двухэтапным дизайном для оценки влияния приема пищи на биодоступность препарата ХС221, таблетки, 100 мг при однократном приеме здоровыми добровольцами». Москва: 2022. [Otchet o klinicheskom issledovanii «Otkrytoe randomizirovannое perekrestnoe issledovanie s 2 vidami terapii (natoshchak i posle edy), 3 periodami, 2 posledovatelynostyami i adaptivnym, dvuhetapnym dizajnom dlya ocenki vliyaniya priema pishchi na biodostupnost' preparata HS221, tabletki, 100 mg pri odnokratnom prieme zdorovymi dobrovol'cami». Moscow: 2022. (In Russ).].
8. Molins E, Cobo E, Ocaña J. Two-stage designs versus European scaled average designs in bioequivalence studies for highly variable drugs: Which to choose? *Stat Med*. 2017 Dec 30;36(30):4777–4788. DOI: 10.1002/sim.7452.
9. Potvin D, DiLiberti CE, Hauck WW, et al. Sequential design approaches for bioequivalence studies with crossover designs. *Pharm Stat*. 2008 Oct-Dec;7(4):245–262. DOI: 10.1002/pst.294.
10. Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies. *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences*. 2004 Jun 20;34(3):223–228.
11. Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 85 «Об утверждении правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» от 03.11.2016 г. [Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission No. 85 «Ob utverzhdenii pravil provedeniya issledovaniy bioekvivalentnosti lekarstvennyh preparatov v ramkah Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza» ot 03.11.2016. (In Russ).].
12. Руководство по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Том 1, 2013 г. [Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennyh sredstv FGBU «NCESMP» Minzdrava Rossii, Vol. 1, 2013. (In Russ).].
13. Koziolk M, Alcaro S, Augustijns P, et al. The mechanisms of pharmacokinetic food-drug interactions - A perspective from the UNGAP group. *Eur J Pharm Sci*. 2019 Jun 15;134:31–59. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.04.003.

Оценка перспективы использования модели гестационного сахарного диабета для поиска средств фармакологической коррекции нарушений у потомства крыс

© Соломина А. С., Родина А. В., Качалов К. С., Захаров А. Д., Дурнев А. Д.

ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Нарушение гомеостаза глюкозы в системе «мать–плацента–плод» при гестационном сахарном диабете (ГСД) ведёт к пре- и постнатальным отклонениям у потомства. Отсутствие общепризнанной модели ГСД осложняет поиск патогенетических средств предупреждения и коррекции отклонений у потомства. Одной из наиболее близких по причинам возникновения, механизмам развития и клинической картине представляется модель с использованием пищевой нагрузки (высококалорийной диеты) в комбинации с низкими дозами диабетогена стрептозотоцина (ВКД–СТЗ-модель). Отсюда возникла задача по отработке и оценке пригодности ВКД–СТЗ-модели ГСД с целью регистрации отклонений у потомства и последующим определением возможности их фармакологической коррекции. Объектом исследования служили крысы и плоды крыс. Моделирование ГСД предусматривало содержание крыс на высококалорийной диете (ВКД) в течение не менее 10 недель с последующим однократным введением низких доз стрептозотоцина (СТЗ) в первый день беременности. При ВКД в сочетании с СТЗ в дозе 25 мг/кг гипергликемия, характерная для ГСД, регистрируется менее чем у 40 % животных, что в дальнейшем не позволяет достоверно оценить нарушения антенатального и постнатального развития у потомства. Таким образом, использованная модель не перспективна для поиска средств фармакологической коррекции влияния ГСД на потомство.

Ключевые слова: гестационный сахарный диабет; высококалорийная диета; стрептозотоцин; антенатальное развитие; крысы

Для цитирования:

Соломина А. С., Родина А. В., Качалов К. С., Захаров А. Д., Дурнев А. Д. Оценка перспективы использования модели гестационного сахарного диабета для поиска средств фармакологической коррекции нарушений у потомства крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(2):45–53. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-45-53>

Поступила: 27 апреля 2023 г. **Принята:** 30 апреля 2023 г. **Опубликована:** 30 июня 2023 г.

Evaluating the prospects of using gestational diabetes mellitus model to find means of pharmacological correction of the disorders in rat offspring

© Anna S. Solomina, Anastasia V. Rodina, Kirill S. Kachalov, Aleksei D. Zakharov, Andrey D. Durnev

FSBI "Research Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. Imbalance of glucose homeostasis in the mother-placenta-fetus system in case of gestational diabetes mellitus (GDM) leads to pre- and postnatal abnormalities in offspring. Lack of universally recognized GDM-model complicates the search for pathogenetic means to prevent and correct abnormalities in offspring. A model using food load (high-calorie diet) in combination with low doses of diabetogen streptozotocin (HCD-STZ model) seems to be one of the closest in causes, mechanisms of development and clinical findings. Hence, the aim was to work out and assess the suitability of HCD-STZ model of GDM in order to register abnormalities in the offspring and determine the possibility of their pharmacological correction. Rats and its fetuses were the objects of the study. Modeling of GDM involved keeping rats on a high-calorie diet (NCD) for at least 10 weeks followed by a single injection of low-dose STZ on the first day of gestation. The hyperglycemia characteristic of GDM is recorded in less than 40 % of animals in HCD group combined with streptozotocin at a dose of 25 mg/kg. This fact does not allow a reliable assessment of abnormalities of antenatal and postnatal development of offspring. Thus, the model used is not promising for finding means of pharmacological correction of the effect of GDM on offspring.

Keywords: gestational diabetes mellitus; high-calorie diet; streptozotocin; antenatal development; rats

For citations:

Solomina AS, Rodina AV, Kachalov KS, Zaharov AD, Durnev AD. Evaluating the prospects of using gestational diabetes mellitus model to find means of pharmacological correction of the disorders in rat offspring. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(2):45–53. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-45-53>

Received: April 27, 2023. **Accepted:** April 30, 2023. **Published:** June 30, 2023.

Введение / Introduction

Поддержанием гомеостаза глюкозы при беременности обеспечивается нормальное функционирование организма матери и развивающегося плода. Недостаточная секреция инсулина, вызванная адаптационными изменениями в организме женщины в период гестации и направленная на удовлетворения энергетических потребностей матери и плода, может приводить к развитию гестационного сахарного диабета (ГСД).

ГСД проявляется нарушением толерантности к глюкозе, при этом уровень глюкозы в крови может находиться в пределах нормы или повышаться умеренно [1].

Последствия ГСД многообразны. Со стороны материнского организма они проявляются патологиями родовой деятельности, повышенным риском развития сахарного диабета 2 типа (СД2), заболеваний сердечно-сосудистой и выделительной системы [2]. У потомства в пренатальном периоде на фоне ГСД выявляют дистресс

плода, дистоцию, эмбриофетопатию, фетопатию, мёртворождение. При рождении у детей от матерей с ГСД регистрируют макросомию, респираторный дистресс-синдром, гипогликемию, гипокальцемию, недоношенность [3, 4]. У детей в возрасте 1–2 лет наблюдаются снижение интеллектуального развития, расстройства аутистического спектра, синдром дефицита внимания и гиперактивности [5–8]. Отсроченные последствия ГСД у взрослого потомства проявляются ожирением, сахарным диабетом 2 типа, сердечно-сосудистыми патологиями и ранее указанными неврологическими нарушениями, существенно нарушая качество жизни и приводя к инвалидизации [9]. Таким образом, спектр выявляемых нарушений со стороны материнского организма и у потомства актуализирует необходимость поиска, исследования и подбора эффективных фармакологических корректоров.

ГСД возникает спонтанно, его патогенез малоизучен. Существует интерес к созданию экспериментальных моделей ГСД [10], однако общепризнанной и общепотребимой модели на данный момент не существует, что осложняет поиск патогенетических средств лечения и предупреждения пре- и постнатальных отклонений у потомства, возникающих вследствие ГСД. Важнейшим критерием адекватности модели является её схожесть по этиологии, патогенезу и клиническим проявлениям. По отдельным данным научной литературы, такими характеристиками обладает модель с использованием пищевой нагрузки, сочетающая в себе содержание грызунов на высококалорийной диете (ВКД) и введение низких доз диабетогена стрептозотоцина (СТЗ) (ВКД-СТЗ-модель) [11, 12].

Целью данного исследования явилась оценка пригодности ВКД-СТЗ-модели ГСД для выявления пре- и постнатальных нарушений потомства и их фармакологической коррекции.

Материалы и методы / Materials and methods

Биологическая тест-система, содержание, уход. Эксперименты выполнены на самках крыс *Wistar* ($n = 80$), в возрасте 8–10 недель, массой 200–220 г, поставленных из Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Содержание животных соответствовало правилам действующих нормативных документов в области надлежащей лабораторной практики [13–15]. Животные имели постоянный доступ к полнорационному экструдированному брикетированному корму и питьевой фильтрованной воде (фильтр Аквафор Кристалл Квадро [16], Россия).

Все манипуляции с животными были одобрены биоэтической Комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Адаптация крыс в лабораторном виварии осуществлялась в течение 5–7 дней до начала исследования, в период которой проводили ежедневный осмотр внешнего состояния животных и клинический осмотр до рандомизации. Животных распределяли по группам, используя

в качестве критерия массу тела, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения в пределах одного пола более чем на 10 %.

При проведении экспериментов на животных были приняты меры, позволяющие избежать излишних физических страданий или повреждений. Эвтаназию осуществляли методами декапитации.

Моделирование ВКД-СТЗ гестационного диабета.

Крыс содержали не менее 10 недель на высококалорийной диете (ВКД) с 57 % жиров и 12 % углеводов в рационе [17, 18]. Массу, потребление корма и воды фиксировали еженедельно на протяжении 10 недель. Крысы контрольной группы в эти же сроки потребляли полнорационный комбикорм. Через 2 месяца ВКД самок спаривали с интактными самцами, и в первый день беременности (ДБ) однократно внутрибрюшинно вводили цитратный буфер ($t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$) или стрептозотоцин (СТЗ) (cat. # S0130-100MG, Sigma) в цитратном буфере ($t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$) в дозах 20 мг/кг или 25 мг/кг, распределяя крыс по 4 группам:

1. Контрольная ($n = 12$): стандартный полнорационный корм, цитратный буфер внутрибрюшинно однократно;
2. Опытная 1 «ВКД» ($n = 9$): ВКД не менее 10 недель, цитратный буфер внутрибрюшинно однократно;
3. Опытная 2 «ВКД+СТЗ 20» ($n = 11$): ВКД не менее 10 недель, СТЗ 20 мг/кг внутрибрюшинно однократно;
4. Опытная 3 «ВКД+СТЗ 25» ($n = 11$): ВКД не менее 10 недель, СТЗ 25 мг/кг внутрибрюшинно однократно.

Выбор доз СТЗ проводили в соответствии с данными литературы, согласно которым его введение в сочетании с ВКД в дозе ниже 20 мг/кг не вызывает гипергликемии, а дозе 30 мг/кг уже приводит к гибели беременных крыс [11].

Схема исследования по отработке модели ВКД-СТЗ ГСД представлена на рис. 1.

Критерием развития ГСД являлся уровень глюкозы в крови в диапазоне 6,7–16,7 ммоль/л.

Потребление корма и воды. Определяли суммарно по группе (клетке) еженедельно до спаривания: накануне регистрировали исходную массу корма и объём воды, через сутки взвешивали оставшийся в кормушке корм и измеряли объём выпитой воды.

Масса тела. Регистрировали еженедельно до спаривания и на протяжении всей беременности (1-й, 7-й, 14-й и 20-й ДБ).

Измерение глюкозы. Измеряли в венозной крови натошак при помощи глюкометра One Touch Select Plus Flex («ЛайфСкан Юроп ГмбХ», Швейцария [19]) ежемесячно до спаривания и на 20-й ДБ.

Регистрация беременности у крыс. Во второй половине дня к каждому самцу подсаживали по 2 самки. На следующий день у самок специальной петлей брали соскоб из влагалища, наносили содержимое на предметное стекло в каплю воды и исследовали при увеличении $\times 10$. День обнаружения сперматозоидов в мазке принимали за первый ДБ.

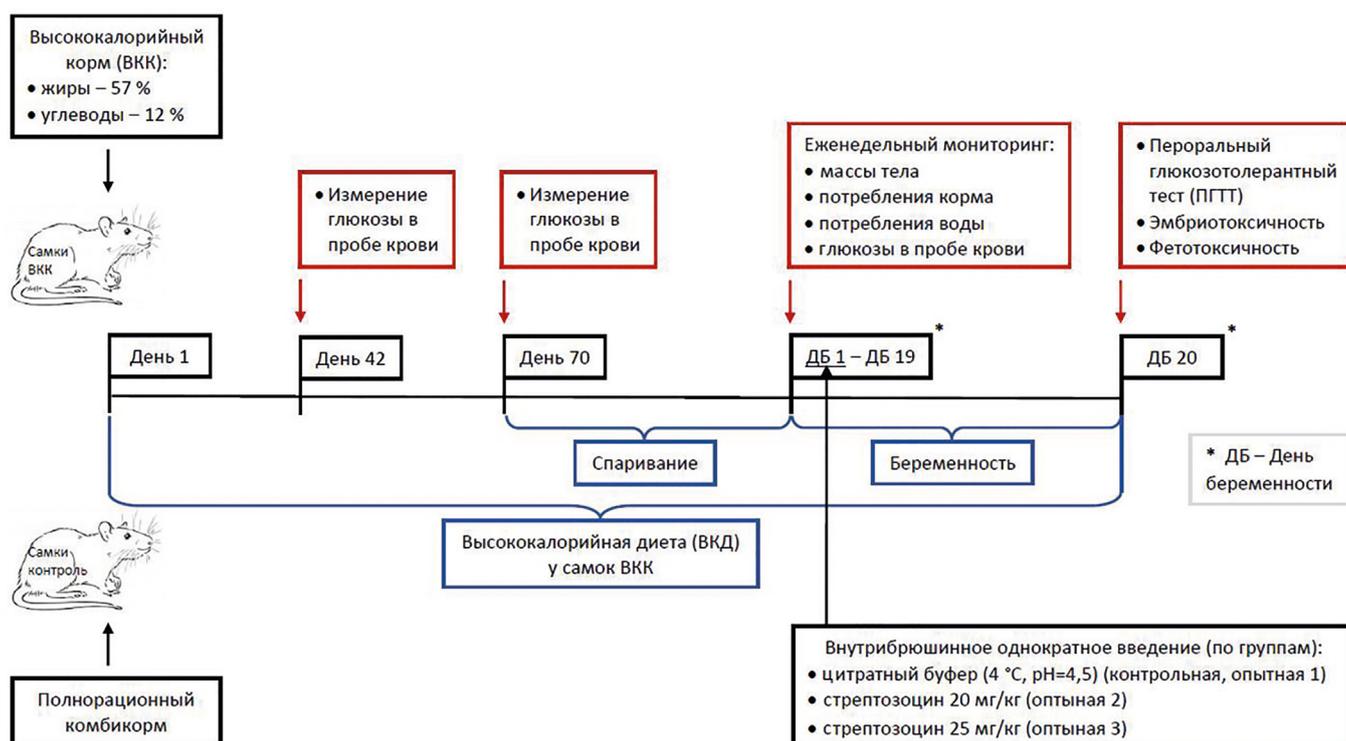


Рис. 1. Схема эксперимента по отработке модели ВКД-СТЗ ГСД
Fig. 1. The scheme of the experiment for testing the HCD-STZ GDM model

Пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ). Выполняли на 20-й ДБ в первой половине дня после 12-часового голодания. Образцы венозной крови отбирали в точках 0, 45, 90 и 120 минут после введения. Раствор D-глюкозы (ДиаЭМ, Россия [20]) вводили перорально однократно в дозе 2 г/кг сразу после забора в 0 точке. Уровень глюкозы в венозной крови измеряли при помощи глюкометра One Touch Select Plus Flex («ЛайфСкан Юроп ГмбХ», Швейцария [19]).

Оценка антенатального развития. На 20-й ДБ самок подвергали эвтаназии и некропсии. Количество желтых тел беременности в яичниках подсчитывали с помощью лупы и тонкой иглы. После вскрытия матки определяли число живых, мёртвых, резорбированных плодов, количество мест имплантаций. Вычисляли показатель пред- и постимплантационной гибели эмбрионов. Живые плоды подвергали внешнему макроскопическому осмотру с помощью лупы от головы к хвосту. Фиксировали кранио-каудальный размер (см) и массу тела плодов (г).

Статистический анализ данных. Проводили согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [21]. Нормальность распределения данных проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилкса. В случае не Гауссовского распределения данных применяли ранговый критерий Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса для оценки раз-

ностей между. При сравнении частотных показателей зависимых выборок применяли точный критерий Фишера. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and Discussion

При содержании на ВКД у крыс выявлены значимые различия по потреблению корма (табл. 1). Крысы опытной группы потребляли значительно больше корма на 2- и 10-й неделях диеты, в остальные сроки, с 3-й по 9-ю недели, крысы опытной группы ели достоверно меньше корма в сравнении с контрольными, что связано с его повышенной пищевой ценностью. Суммарное потребление высококалорийного корма крысами опытной группы было значительно меньше регистрируемого в контрольной группе (рис. 2).

Наблюдение за потреблением воды позволило установить достоверные различия между контрольной и опытной ВКД группами крыс (табл. 2). Самки, содержащиеся на ВКД, пили значительно больше воды в сравнении с контрольными практически на всех сроках регистрации, за исключением 4-й недели. Среднее суточное количество потребляемой воды у ВКД-крыс было достоверно выше наблюдаемого у контрольных (рис. 3).

Таблица 1

Мониторинг суточного потребления корма самками крыс при высококалорийной диете (ВКД)

Table 1

Monitoring of daily feed intake by female rats with a high-calorie diet (NCD)

Группа		Контрольная группа / полнораціонный комбикорм	Опытная группа / ВКД / высококалорийный корм
n		20	60
Недели эксперимента	2	17,0 [16,4÷17,7]	19,7* [17,7÷21,7]
	3	21,1 [20,5÷21,7]	20,0* [18,1÷21,2]
	4	19,9 [18,2÷21,6]	16,7* [15,4÷18,0]
	5	20,5 [19,8÷22,1]	21,9 [18,3÷24,3]
	6	18,5 [17,6÷19,4]	16,9* [15,2÷18,1]
	7	16,1 [15,4÷17,9]	14,9* [13,7÷17,4]
	8	16,4 [15,8÷18,0]	14,0* [13,2÷15,2]
	9	14,9 [14,1÷15,7]	12,1* [11,0÷14,3]
	10	11,5 [10,8÷11,8]	13,1* [11,8÷14,6]

Примечания: данные представлены в виде медиан групп и 25 % и 75 % квартилей; * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни); n — число животных в группе.

Notes: the data are presented in the form of median groups and 25 % and 75 % quartiles; * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Mann–Whitney test); n — the number of animals in the group.

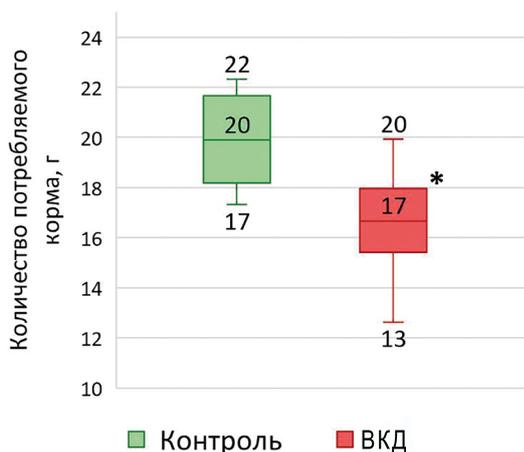


Рис. 2. Среднее суточное потребление корма с 1-й по 10-ю недели содержания крыс на высококалорийной диете
Fig. 2. Average daily feed intake from 1 to 10 weeks of keeping rats on a high-calorie diet

Примечание: * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни).

Note: * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Mann–Whitney test).

Таблица 2

Мониторинг суточного потребления воды самками крыс при высококалорийной диете (ВКД)

Table 2

Monitoring of daily water intake by female rats with a high-calorie diet (NCD)

Группа		Контрольная группа / полнораціонный комбикорм	Опытная группа / ВКД / высококалорийный корм
n		20	60
Недели эксперимента	2	28,0 [27,2÷30,8]	32,8* [31,4÷34,9]
	3	40,0 [38,7÷41,2]	44,6* [41,1÷47,6]
	4	40,3 [34,5÷43,9]	40,9 [38,8÷44,1]
	5	36,1 [34,7÷36,5]	40,7* [33,9÷42,7]
	6	34,7 [33,6÷36,0]	42,7* [37,6÷46,9]
	7	32,2 [29,7÷35,1]	36,8* [31,8÷40,7]
	8	35,7 [34,8÷38,4]	40,5* [37,0÷43,0]
	9	33,3 [32,4÷35,7]	32,7 [29,8÷37,2]
	10	29,5 [28,5÷31,4]	35,2* [32,2÷38,5]

Примечания: данные представлены в виде медиан групп и 25 % и 75 % квартилей; * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни); n — число животных в группе.

Notes: the data are presented as medians of groups and 25 % and 75 % quartiles; * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Mann–Whitney test); n — the number of animals in the group.

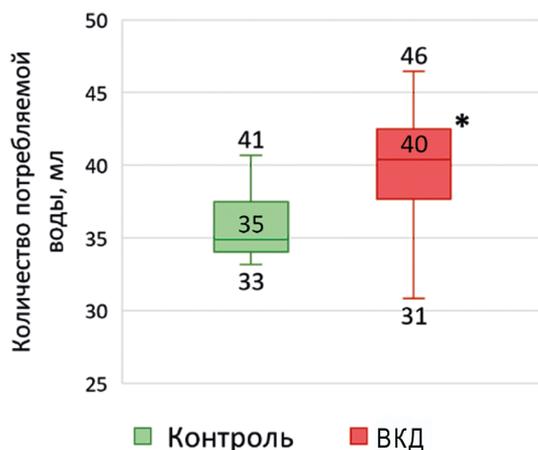


Рис. 3. Среднее суточное потребление воды с 1-й по 10-ю недели содержания крыс на высококалорийной диете (ВКД)
Fig. 3. Average daily water intake from 1 to 10 weeks of keeping rats on a high-calorie diet (NCD)

Примечание: * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни).

Note: * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Mann–Whitney test).

Данные по приросту массы тела самок крыс отражены в табл. 3. Потребление самками высококалорийного корма привело к достоверному увеличению прироста массы тела как на отдельных этапах наблюдения, так и суммарного прироста с 1-й по 6-ю недели и с 1-й по 10-ю недели ВКД по сравнению с контрольной группой (рис. 4).

Таблица 3
Еженедельный прирост массы самок крыс при высококалорийной диете (ВКД)

Table 3
Monitoring of daily water intake by female rats with a high-calorie diet (NCD)

Группа		Контрольная группа /полнораціонный комбикорм	Опытная группа / ВКД /высококалорийный корм
n		20	60
Недели эксперимента	0-1	18,0 [13,0÷20,5]	24,0* [17,5÷30,0]
	1-2	8,0 [6,0÷10,5]	9,0 [5,5÷14,0]
	2-3	11,0 [7,0÷16,0]	11,5 [8,0÷15,5]
	3-4	11,5 [8,5÷14,5]	10,0 [6,5÷16,0]
	4-5	7,0 [2,5÷8,5]	8,5* [5,0÷12,0]
	5-6	7,5 [4,5÷10,5]	8,0 [4,5÷12,0]
	6-7	2,0 [0,5÷4,5]	6,0* [2,5÷10,0]
	7-8	5,0 [2,5÷6,5]	5,0 [2,0÷7,0]
	8-9	4,0 [2,0÷6,0]	4,0 [2,0÷7,0]
	9-10	1,5 [0,0÷4,5]	3,0 [1,5÷7,0]
	0-10	70,0 [63,0÷87,0]	90,5* [74,0÷108,0]

Примечания: данные представлены в виде медиан групп и 25 % и 75 % квартилей; * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни); n — число животных в группе.

Notes: the data are presented as medians of groups and 25 % and 75 % quartiles; * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Mann–Whitney test); n — the number of animals in the group.

В табл. 4 представлены результаты измерения концентрации глюкозы в венозной крови крыс. Уровень глюкозы в крови у крыс опытной группы в конце первого месяца ВКД значимо не отличался от контрольной группы. Однако в конце второго месяца диеты у ВКД-крыс зафиксировано достоверное увеличение содержания глюкозы в венозной крови по сравнению со значениями контрольной группы (табл. 4).

После содержания крыс на ВКД в течение 2 месяцев самок крыс спаривали с интактными самцами. Беременных распределяли в 4 экспериментальные группы. Контрольной и опытной ВКД-группе в 1-й ДБ вводили однократно внутривентриально цитратный буфер. Опытным группам ВКД+СТЗ 20 и ВКД+СТЗ 25 в 1-й ДБ вводили однократно внутривентриально СТЗ в дозах 20 мг/кг или 25 мг/кг, соответственно. Животных опытных групп продолжали содержать на ВКД до момента забора биоматериала на 20-й ДБ, контрольная группа в эти же сроки потребляла стандартный полнораціонный корм.

Прирост массы тела беременных крыс представлен в табл. 5. У ВКД-крыс прирост массы тела в отдельные периоды наблюдения и суммарный прирост значимо не отличался от контрольной группы. В группе ВКД+СТЗ 20 отмечено достоверное увеличение массы с 7-й по 14-й и с 1-й по 20-й ДБ. У крыс ВКД+СТЗ 25 значимое повышение прироста массы тела установлено только с 7-й по 14-й ДБ. Показатель суммарного прироста массы крыс этой группы был выше наблюдаемого в контрольной, однако не был статистически значимым.

На 20-й ДБ уровень глюкозы, характерный для ГСД, отмечен у 11 % животных из группы, содержащейся на ВКД (1 крыса из 9), у 17 % крыс группы ВКД+СТЗ 20 (2 крысы из 12) и у 40 % крыс из группы ВКД+СТЗ 25 (4 крысы из 10) (рис. 5). Следует отметить, что содержание глюкозы в крови у беременных из группы ВКД+СТЗ 25 составило в среднем 14,7 ммоль/л (рис. 6),

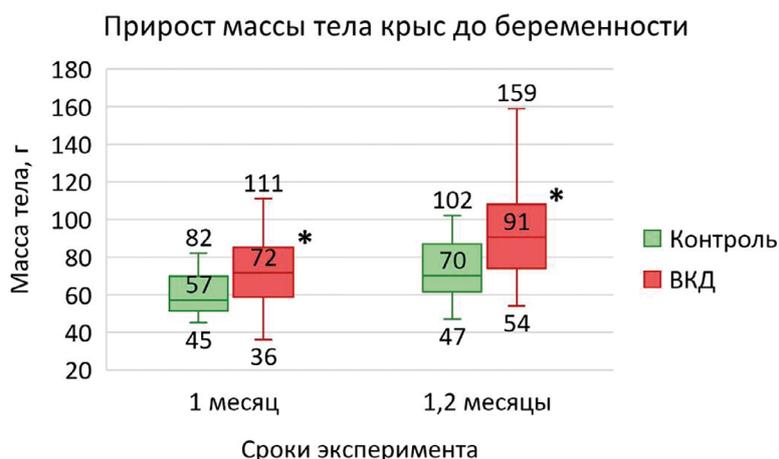


Рис. 4. Прирост массы тела в течение содержания крыс на высококалорийной диете (ВКД)

Fig. 4. Body weight gain during the maintenance of rats on a high-calorie diet (NCD)

Примечание: * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни).

Note: * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Mann–Whitney test).

Таблица 4

Результаты измерения глюкозы в пробе крови самок (ммоль/л)

Table 4

Results of glucose measurement in the blood sample of females (mmol/l)

Группа	n	Месяц эксперимента	
		1	2
Контрольная группа / полнорационный комбикорм	20	5,4 [4,9÷5,7]	5,8 [5,2÷6,4]
Опытная группа / ВКД / высококалорийный корм	60	5,4 [4,9÷5,8]	6,7* [6,3÷7,0]

Примечания: данные представлены в виде медиан групп и 25 % и 75 % квартилей; * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни); n — число животных в группе.

Notes: the data are presented as medians of groups and 25 % and 75 % quartiles; * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Mann–Whitney test); n — the number of animals in the group.

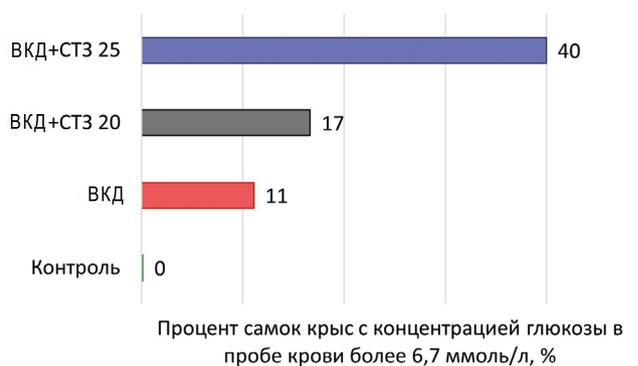


Рис. 5. Количество самок с уровнем глюкозы в крови, характерным при гестационном сахарном диабете (ГСД)

Fig. 5. The number of females with blood glucose levels characteristic of gestational diabetes mellitus (GDM)

Таблица 5

Прирост массы беременных криси в ВКД-СТЗ модели

Table 5

Weight gain of pregnant rats in the HCD-STZ model

Группа	n	Дни беременности			
		1–7	7–14	14–20	14–20
Контрольная группа / полнорационный комбикорм	13	10,6 [10,6÷11,0]	14,9 [7,0÷14,9]	44,2 [31,0÷57,5]	69,7 [59,0÷83,0]
Опытная группа / ВКД / высококалорийный корм	9	18,0 [17,0÷21,0]	19,1 [16,0÷25,0]	35,4 [32,0÷37,0]	80,5 [70,0÷87,1]
Опытная группа / ВКД+СТЗ 20 / высококалорийный корм, СТЗ 20 мг/кг	12	13,5 [8,5÷14,5]	32,3* [29,0÷39,0]	42,9 [32,4÷53,0]	88,5* [83,0÷107,0]
Опытная группа / ВКД+СТЗ 25 / высококалорийный корм, СТЗ 25 мг/кг	10	10,8 [0,0÷16,0]	29,8* [26,0÷35,0]	32,3 [12,0÷48,0]	86,0 [52,0÷94,0]

Примечания: данные представлены в виде медиан групп и 25 % и 75 % квартилей; * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Краскела–Уоллиса); n — число животных в группе.

Notes: the data are presented as medians of groups and 25 % and 75 % quartiles; * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Kruskal–Wallis test); n — the number of animals in the group.

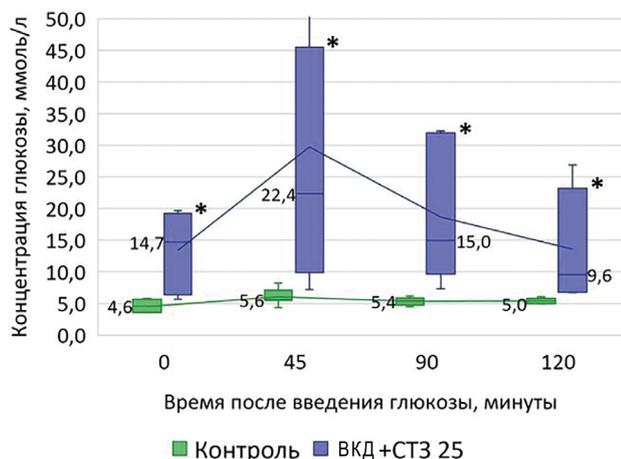


Рис. 6. Данные перорального глюкозотолерантного теста (ПГТТ) на 20-й день беременности (ДБ)

Fig. 6. Data of the oral glucose tolerance test (OGTT) on the 20th day of pregnancy (DP)

Примечание: * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни).

Note: * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Mann–Whitney test).

что характерно для тяжёлой степени диабета и существенно превышает показатели глюкозы при ГСД [16], которые могут быть в пределах нормы или повышаться умеренно.

В связи с низким числом животных с гипергликемией, характерной для ГСД, которое составило менее 40 %, не представилось возможным оценить постнатальное развитие потомства. Ниже представлены данные по ПГТТ и антенатальному развитию плодов от крыс из группы ВКД+СТЗ 25.

Результаты ПГТТ крыс группы ВКД+СТЗ 25 представлены на рис. 6 и характеризовались нарушением толерантности к глюкозе у этих животных.

Параметры антенатального развития потомства от 4 крыс в ВКД-СТЗ модели отражены в табл. 6 и 7. Содержание крыс на ВКД с последующим однократным введением стрептозотоцина в дозе 25 мг/кг не влияло на показатели спонтанной пред- и постимплантационной гибели эмбрионов, определяемой на основании подсчёта числа жёлтых тел, мест имплантаций, живых плодов.

Различий в кранио-каудальных размерах плодов от крыс опытной группы не зафиксировано, однако выявлено значимое снижение массы тела у плодов мужского

пола по сравнению с контрольной группой. Негативного влияния на параметры эмбрионального развития не установлено: плодные оболочки были правильно сформированы, амниотическая жидкость прозрачна, плацента полнокровна, без признаков склероза. При рассечении плодных оболочек и пересечении пуповины дыхание плодов становилось самостоятельным, кожные покровы были розового цвета. Поверхность кожи имела морщинистый, крупноскладчатый вид, спина была выпрямлена, глаза и уши закрыты. Однако важно отметить, что в связи с небольшой выборкой беременных крыс с гипергликемией ($n = 4$) сделать достоверное заключение по результатам эмбрионального развития плодов не представилось возможным.

Заключение / Conclusion

Таким образом, при содержании крыс на ВКД в течение не менее 10 недель с последующим однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина в первый день беременности гипергликемия, характерная для ГСД, регистрируется менее чем у 40 % животных, что не позволяет достоверно оценить нарушения ан-

Таблица 6

Эмбриональное развитие плодов от ВКД-СТЗ крыс

Table 6

Embryonic development of fetuses from HCD-STZ rats

Группа	Число жёлтых тел на 1 самку	Число мест имплантаций на 1 самку	Предимплантационная гибель, %	Число живых плодов на 1 самку	Постимплантационная гибель, %
Контрольная группа /полнора- ционный комбикорм	12,5 [10,5÷13,5]	8,5 [5,5÷11,5]	0,3 [0,1÷,5]	6,5 [4,0÷10,0]	0,2 [0,1÷0,3]
Опытная группа /ВКД+СТЗ 25 / высококалорийный корм, СТЗ 25 мг/кг	11,0 [11,0÷14,0]	10,0 [10,0÷14,0]	0,1 [0,0÷0,1]	10,0 [5,0÷12,0]	0,1 [0,0÷0,2]

Примечания: данные представлены в виде медиан групп и 25 % и 75 % квартилей; * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни).

Notes: the data are presented in the form of medians of groups and 25 % and 75 % quartiles; * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Mann–Whitney criterion).

Таблица 7

Антенатальное развитие плодов от ВКД-СТЗ крыс

Table 7

Antenatal development of fetuses from HCD-STZ rats

Группа	Средняя масса плодов, г		Средний размер плодов, мм	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Контрольная группа /полнора- ционный комбикорм	30,0 [30,0÷30,0]	29,0 [28,0÷30,0]	2,5 [2,4÷2,7]	2,5 [2,3÷2,6]
Опытная группа / ВКД+СТЗ 25 / высокока- лорийный корм, СТЗ 25 мг/кг	29,0* [28,0÷29,0]	29,0 [29,0÷29,0]	2,5 [2,4÷2,6]	2,5 [2,4÷2,7]

Примечания: данные представлены в виде медиан групп и 25 % и 75 % квартилей; * — статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни).

Notes: the data are presented as medians of groups and 25 % and 75 % quartiles; * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group (Mann–Whitney test).

тенатального и постнатального развития потомства на фоне ГСД. Кроме того, уровень глюкозы у крыс, содержащихся на высококалорийной диете в сочетании с однократным введением стрептозотоцина в дозе 25 мг/кг, соответствует тяжёлой степени диабета. Полученные результаты показывают, что ВКД-СТЗ модель не перспективна для поиска средств фармакологической коррекции влияния ГСД на потомство.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. У авторов отсутствует какой-либо конфликт интересов.

Conflict of interest. The authors do not have any conflict of interest.

Участие авторов. Соломина А. С., Дурнев А. Д. — разрабатывали дизайн исследования; Соломина А. С., Качалов К. С., Захаров А. Д. — руководили доклиническим этапом исследования; Родина А. В. — выполняла статистическую обработку полученных результатов; Соломина А. С., Родина А. В. — участвовали в оформлении рукописи; все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов.

Participation of authors. Solomina AS, Durnev AD — developed the design of a preclinical research; Solomina AS, Kachalov KS, Zaharov AD — were responsible for the preclinical phase of the study; Rodina AV — performed statistical processing of the results; Solomina AS, Rodina AV — wrote the text of the manuscript; all the authors participated in the discussion of the results obtained.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Соломина Анна Сергеевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: solomina@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7048-4993>

SPIN-код: 7475-9613

к. б. н., с. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Anna S. Solomina

Corresponding author

e-mail: solomina@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7048-4993>

SPIN code: 7475-9613

PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Officer of the laboratory of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Родина Анастасия Владимировна

e-mail: an.vl.rodina@gmail.com

SPIN-код: 1254-7322

м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Anastasia V. Rodina

e-mail: an.vl.rodina@gmail.com

SPIN code: 1254-7322

Junior researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Качалов Кирилл Сергеевич

e-mail: kkachalov@mail.ru

SPIN-код: 2992-6789

аспирант, м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Kirill S. Kachalov

e-mail: kkachalov@mail.ru

SPIN code: 2992-6789

graduate student, Junior researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Захаров Алексей Дмитриевич

e-mail: Alex.zakharov91@mail.ru

SPIN-код: 9013-6228

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

Aleksei D. Zakharov

e-mail: Alex.zakharov91@mail.ru

SPIN code: 9013-6228

Junior researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Дурнев Андрей Дмитриевич

e-mail: durnev@academpharm.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

SPIN-код: 8426-0380

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

Andrey D. Durnev

e-mail: durnev@academpharm.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

SPIN code: 8426-0380

Dr. Sci (Med.), professor, corresponding member RAS, Head of the department of drug toxicology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. niddk.nih.gov [Internet]. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases [доступ от 03.03.2023]. URL: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes/gestational-management-treatment>.
2. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, et al. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3342. DOI: 10.3390/ijms19113342.
3. Кс К, Shakya S, Zhang H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Ann Nutr Metab*. 2015;66 Suppl 2:14–20. DOI: 10.1159/000371628.
4. Ornoy A. Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. *Reprod Toxicol*. 2011 Sep;32(2):205–12. DOI: 10.1016/j.reprotox.2011.05.002.
5. Nahum Sacks K, Friger M, Shoham-Vardi I, et al. Prenatal exposure to gestational diabetes mellitus as an independent risk factor for long-term neuropsychiatric morbidity of the offspring. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Sep;215(3):380.e1–7. DOI: 10.1016/j.ajog.2016.03.030.
6. Su CH, Liu TY, Chen IT, et al. Correlations between serum BDNF levels and neurodevelopmental outcomes in infants of mothers with gestational diabetes. *Pediatr Neonatol*. 2021 May;62(3):298–304. DOI: 10.1016/j.pedneo.2020.12.012.
7. Chen S, Zhao S, Dalman C, et al. Association of maternal diabetes with neurodevelopmental disorders: autism spectrum disorders, attention-deficit/hyperactivity disorder and intellectual disability. *Int J Epidemiol*. 2021 May 17;50(2):459–474. DOI: 10.1093/ije/dyaa212.
8. Perea V, Urquiza X, Valverde M, et al. Influence of Maternal Diabetes on the Risk of Neurodevelopmental Disorders in Offspring in the Prenatal and Postnatal Periods. *Diabetes Metab J*. 2022 Nov;46(6):912–922. DOI: 10.4093/dmj.2021.0340.
9. Johns EC, Denison FC, Norman JE, Reynolds RM. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends Endocrinol Metab*. 2018 Nov;29(11):743–754. DOI: 10.1016/j.tem.2018.09.004.
10. Pasek RC, Gannon M. Advancements and challenges in generating accurate animal models of gestational diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013 Dec 1;305(11):E1327–38. DOI: 10.1152/ajpendo.00425.2013.
11. Xu W, Tang M, Wang J, Wang L. Anti-inflammatory activities of puerarin in high-fat diet-fed rats with streptozotocin-induced gestational diabetes mellitus. *Mol Biol Rep*. 2020 Oct;47(10):7537–7546. DOI: 10.1007/s11033-020-05816-6.
12. Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, et al. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr*. 2009 Oct 19;1(1):21. DOI: 10.1186/1758-5996-1-21.
13. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». [The Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated November 3, 2016 № 81 «Ob utverzhdenii pravil nadlezhashchei laboratornoi praktiki Evraziiskogo ekonomicheskogo soyuza v sfere obrashcheniya lekarstvennykh sredstv». (In Russ.)]. URL: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01211928/cncd_21112016_81. Ссылка активна на 03.02.2023.
14. ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание) [GOST 33215-2014 «Guidelines for accommodation and care of animals. Rules for the equipment of premises and the organization of procedures». (Reissue) (In Russ.)]. Межгосударственный стандарт: изд. офиц.: дата введения 2016-07-01 // Москва: Стандартинформ. 2019. 13 с.
15. ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». (Переиздание). Межгосударственный стандарт: изд. офиц.: дата введения 2016-07-01. Москва: Стандартинформ. 2019. 10 с. [GOST 33216-2014 «Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits». (Reissue). Mezhgosudarstvennyj standart: izd. ofic.: data vvedeniya 2016-07-01. Moscow: Standartinform. 2019. (In Russ.)].
16. aquaphor.ru [Internet]. Российская компания Акфафор [доступ от 07.02.2023]. URL: <https://www.aquaphor.ru/>
17. Arafa EA, Hassan W, Murtaza G, Buabeid MA. Ficus carica and Sizigium cumini Regulate Glucose and Lipid Parameters in High-Fat Diet and Streptozocin-Induced Rats. *J Diabetes Res*. 2020 Oct 28;2020:6745873. DOI: 10.1155/2020/6745873.
18. Derkach KV, Bondareva VM, Chistyakova OV, et al. The Effect of Long-Term Intranasal Serotonin Treatment on Metabolic Parameters and Hormonal Signaling in Rats with High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:245459. DOI: 10.1155/2015/245459.
19. lifescan.com [Internet]. Malvern: LifeScan, Inc.; [доступ от 05.02.2023]. URL: <https://www.lifescan.com/>.
20. dia-m.ru [Internet]. Российская компания Диаэм [доступ от 06.02.2023]. URL: <https://www.dia-m.ru/>.
21. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б., Маевский Е.И. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К; 2012. [Sergienko VI, Bondareva IB, Maevskii EI. Metodicheskie rekomendatsii po statisticheskoi obrabotke rezul'tatov doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Ed by Mironov AN. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ.)].

Сочетание высокоуглеводной диеты и стрептозотоцина для моделирования сахарного диабета 2 типа у крыс Вистар

© *Иванов С. В., Островская Р. У.*

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность. Для проведения доклинической оценки эффективности антидиабетических лекарственных средств необходимы модели, имитирующие патогенез и основные проявления сахарного диабета (СД) у человека. Стрептозотоциновая (СТЗ) модель, получившая наиболее широкое распространение в эксперименте, не позволяет воспроизводить поэтапное многофакторное развитие СД 2 типа. **Цель.** Разработать модель СД 2 типа с использованием высокоуглеводной диеты в сочетании с подпороговой дозой СТЗ у крыс Вистар, характеризующуюся гипергликемией и инсулинорезистентностью. **Методы.** Животные контрольные группы ($n = 20$) получали в качестве питья воду, а экспериментальной группы ($n = 20$) — 10 % раствор фруктозы. Через 14 дней по 10 животным из каждой группы вводили СТЗ в дозе 35 мг/кг. Уровень глюкозы в крови определяли еженедельно. Для оценки инсулинорезистентности до и после введения СТЗ проводили тест толерантности к глюкозной нагрузке. **Результаты.** Установлено, что содержание крыс на высокоуглеводной диете в течение двух недель ведёт к нарушению толерантности к глюкозной нагрузке, что свидетельствует об инсулинорезистентности. Введение СТЗ в подпороговой дозе 35 мг/кг животным, находящимся на стандартной диете, вызывает повышение урона гликемии до 13,2 ммоль/л, в то время как эта же доза СТЗ на фоне высокоуглеводной диеты вызывает повышение уровня гипергликемии до 22,9 ммоль/л и усиливает инсулинорезистентность. **Заключение.** Синергизм высокоуглеводной диеты и низких доз СТЗ позволяет получить модель сахарного диабета 2 типа, воспроизводящую не только базальную гипергликемию, но и нарушение толерантности к глюкозе, что в более полной мере соответствует процессу развития СД 2 типа у человека.

Ключевые слова: сахарный диабет; инсулинорезистентность; доклинические исследования

Для цитирования:

Иванов С. В., Островская Р. У. Сочетание высокоуглеводной диеты и стрептозотоцина для моделирования сахарного диабета 2 типа у крыс Вистар. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(2):54–59. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-54-59>

Поступила: 25 марта г. **Принята:** 31 марта 2023 г. **Опубликована:** 30 июня 2023 г.

Combination of a high-carbohydrate diet and streptozotocin for modeling type 2 diabetes in Wistar rats

© Sergei V. Ivanov, Rita U. Ostrovskaya

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. To conduct a preclinical evaluation of the effectiveness of antidiabetic drugs, models simulating the pathogenesis and main manifestations of diabetes mellitus (DM) in humans are needed. The streptozotocin (STZ) model, which has received the most widespread use in the experiment, does not allow reproducing the stepwise multifactorial development of type 2 diabetes. **Goal.** To develop a model of type 2 diabetes using a high-carbohydrate diet in combination with a subthreshold dose of STZ in Wistar rats, characterized by hyperglycemia and insulin resistance. **Methods.** The animals of the control group ($n = 20$) received water as a drink, and the experimental group ($n = 20$) received a 10 % solution of fructose. After 14 days, 10 animals from each group were injected with STZ at a dose of 35 mg/kg. The blood glucose level was determined weekly. To assess insulin resistance, an oral glucose tolerance test was performed before and after the administration of STZ. **Results.** It was found that keeping rats on a high-carbohydrate diet for two weeks leads to a violation of glucose tolerance, which indicates insulin resistance. The introduction of STZ at a subthreshold dose of 35 mg/kg to animals on a standard diet causes an increase in the glycemic drop to 13.2 mmol/l, while the same dose of STZ against the background of a high-carbohydrate diet causes an increase in the level of hyperglycemia to 22.9 mmol/l and increases insulin resistance. **Conclusion.** The synergism of a high-carbohydrate diet and low doses of STZ makes it possible to obtain a model of type 2 diabetes mellitus that reproduces not only basal hyperglycemia, but also impaired glucose tolerance, which more fully corresponds to the process of developing type 2 diabetes in humans.

Keywords: diabetes mellitus; insulin resistance; preclinical studies

For citations:

Ivanov SV, Ostrovskaya RU. Combination of a high-carbohydrate diet and streptozotocin for modeling type 2 diabetes in Wistar rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(2):XX–XX. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-XX-XX>

Received: March 21, 2023. **Accepted:** March 31, 2023. **Published:** June 30, 2023.

Введение / Introduction

Неуклонный рост распространённости сахарного диабета (СД) является важнейшей медико-социальной проблемой большинства стран мира. По данным Международной федерации диабета (IDF), в 2021 году в мире насчитывалось 537 млн взрослых с диабетом с прогнозируемым увеличением до 693 млн к 2045 году в случае непринятия эффективных мер по профилактике и лечению заболевания. Согласно национальному регистру больных СД, в России ежегодно выявляется

более 130 тысяч случаев данного заболевания; около 6 миллионов россиян находятся в состоянии предиабета. Недостатки имеющихся антидиабетических препаратов обуславливают необходимость поиска новых средств для его лечения.

Известно, что доклиническое исследование эффективности антидиабетических лекарственных средств проводится на различных экспериментальных моделях СД, которые могут быть основаны на использовании генетически-модифицированных животных или введении диабетогенных токсинов. Среди второй группы

моделей наиболее распространённой является стрептозотоциновая (СТЗ) модель. СТЗ — цитотоксический агент, избирательно поражающий панкреатические β -клетки, в результате чего отмечается снижение продукции инсулина и гипергликемия [1].

В зависимости от используемой дозы, СТЗ может вызывать частичную или полную гибель инсулиноцитов. Под действием высоких доз СТЗ (50–70 мг/кг) у крыс наблюдается до 90 % деструкции панкреатических β -клеток, что соответствует экспериментальной модели СД 1 типа [2], в то время как инъекции более низких доз СТЗ (40–45 мг/кг), дробное многократное введение малых доз [3] или предшествующая защита поджелудочной железы никотинамидом вызывают умеренную гипергликемию при потере 40–50 % активных β -клеток, что может свидетельствовать о моделировании СД 2 типа [4]. Ранее нами отмечалось сохранение 48 % жизнеспособных β -клеток в экспериментах на крысах при введении СТЗ в дозе 45 мг/кг, вызывающей выраженную гипергликемию до 28,5 ммоль/л [5].

Известно, что развитие СД 2 типа носит фазовый характер. Инсулинорезистентность, обусловленная уменьшением числа рецепторов инсулина в жировой ткани и печени, а также нарушениями пострецепторных взаимодействий в инсулинзависимых тканях, вызывает компенсаторное усиление секреции инсулина, что на начальных стадиях развития СД обеспечивает поддержание гликемии в пределах нормы или её незначительное повышение. Однако хроническая гиперинсулинемия вызывает десенситизацию рецепторов клеток-мишеней и истощение панкреатических β -клеток, в результате чего на следующей стадии СД 2 типа относительная инсулиновая недостаточность становится абсолютной, сопровождающаяся значительной гипергликемией [6].

Применение различных доз СТЗ не позволяет воспроизводить постадийное развитие СД 2 типа [7], в связи с чем становится очевидной необходимость разработки экспериментальных моделей СД, способных вызывать не только абсолютную инсулиновую недостаточность, но и предшествующую ей инсулинорезистентность, основной причиной развития которой является несбалансированное питание и ожирение.

Нарушение пищевого режима в эксперименте воспроизводится путём длительного содержания животных на диетах, обогащённых жирами и/или углеводами. Однако большая часть этих моделей вызывают незначительную гипергликемию [8]. Как нами было показано ранее, 12-недельная высокожировая диета у крыс Вистар способствует формированию абдоминального ожирения, гиперхолестеринемии и предиабета с гликемией не более 7,0 ммоль/л, но не развитого СД 2 типа [9].

Учитывая широкую распространённость использования фруктозы в качестве подсластителя [10], в настоящей работе для моделирования СД 2 типа у

крыс, приближённого к соответствующей патологии человека, использовалась высокоуглеводная диета, основанная на замене питьевой воды 10 % раствором фруктозы с последующим введением СТЗ в дозе 35 мг/кг.

Цель исследования / The purpose of the study — установить, возможно ли в опытах на крысах, используя данную диету в сочетании с подпороговой дозой СТЗ, воспроизвести основные признаки СД 2 типа — базальную гипергликемию и нарушение толерантности к глюкозной нагрузке.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные / Animals. Эксперименты выполнены на взрослых крысах-самцах Вистар с исходной массой тела 240–250 г, полученных из питомника Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животные имели свободный доступ к корму, за исключением 18 ч, предшествующих введению СТЗ, и проведению теста толерантности к глюкозе. Животные содержались в соответствии с ГОСТ 33215-2014 при температуре 22 ± 3 °C и 12-часовой длительности светового дня. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (протокол №3 от 05.09.2022 г.).

Вещества / Substances. Для моделирования высокоуглеводной диеты использовали кристаллическую D-фруктозу (ЛенРеактив, Россия). В качестве диабетогенного токсина применяли СТЗ (Sigma Aldrich, США). Для проведения теста толерантности использовали D-глюкозу (Sigma Aldrich, США).

Дизайн эксперимента / Experiment design. Как следует из рис. 1, крысы ($n = 40$) были распределены случайным образом на две равные группы: в контрольной группе ($n = 20$) животные в качестве питья получали воду, в группе экспериментальных животных ($n = 20$) вместо питьевой воды применялся 10 % раствор фруктозы (399 ккал на 1 л). Животные получали стандартный полнорационный гранулировано-экструдированный корм для грызунов «Профгрызун» (Россия). Через 14 дней каждая из двух групп была поделена на две подгруппы (по 10 крыс), одной из которых однократно вводили СТЗ в дозе 35 мг/кг, растворённый в холодном цитратном буфере (рН 4,5), другой — цитратный буфер. За 18 ч до введения СТЗ корм убирала, а раствор фруктозы заменяли питьевой водой.

Измерение уровня глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены крыс, проводили с помощью глюкометра One Touch Select Plus Flex (LifeScan, Швейцария) до начала эксперимента и в 14-, 21-, 28-, 35- и 42-й дни. Учёт потребления корма проводили ежедневно, определение массы тела животных — еженедельно.

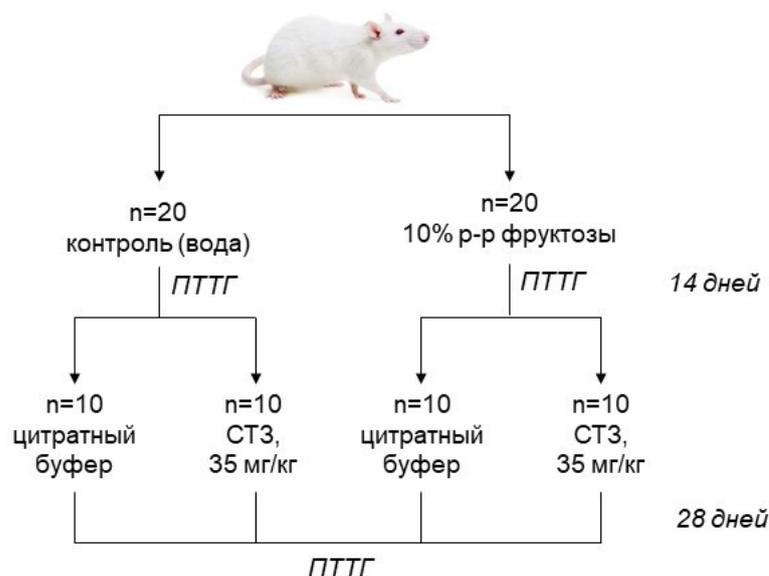


Рис. 1. Дизайн эксперимента
Fig. 1. Experiment design
 Источник: Иванов С.В. и соавт., 2023 г.
 Source: Ivanov SV et al., 2023

Пероральный тест толерантности к глюкозе (ПТТГ). На 14-й день эксперимента проводили ПТТГ. За 18 часов до проведения теста животным прекращали доступ к пище при свободном доступе к воде, при этом животным, находящимся на высокоуглеводной диете, раствор фруктозы заменяли водой. Глюкозу вводили перорально в дозе 3 г/кг. Образцы крови отбирали из хвостовой вены непосредственно перед (0), а также через 30, 60, 90 и 120 мин после введения глюкозы. Повторный ПТТГ проводили на 42-й день эксперимента. Эффективность теста оценивали путём расчёта площади под кривой (AUC) «концентрация–время».

Статистический анализ. Полученные результаты обрабатывали в программе Biostat 2007 (версия 3.9). Характер распределения полученных данных определяли по критерию Шапиро–Уилка. В связи с наличием нормального распределения данных статистическую значимость различий между группами оценивали с помощью ANOVA с последующим тестом Бонферрони. Рассчитывали среднее арифметическое значение (M) и стандартную ошибку среднего арифметического (SEM). Различия средних показателей считалось достоверным при $p < 0,05$.

Результаты / Results

1. Влияние высокоуглеводной диеты на базальный уровень гликемии, потребление корма и массу тела у здоровых животных. Установлено, что содержание крыс на высокоуглеводной диете, обусловленной заменой питьевой воды на 10 % раствор фруктозы, в течение 14 дней вызывает незначительное повышение базаль-

ного уровня гликемии (рис. 2). В дальнейшем такая диета способствует его поддержанию на уровне 8,5–9,0 ммоль/л (табл. 1), что позволяет характеризовать данную модель как модель начальной стадии СД 2 типа.

Замена питьевой воды 10 % раствором фруктозы не способствует набору массы тела животных. Животные, получавшие воду, за первые две недели прибавили в массу в среднем $45,5 \pm 5,1$ г, в то время как крысы, получавшие фруктозу — $14,9 \pm 6,1$ г ($p < 0,05$).

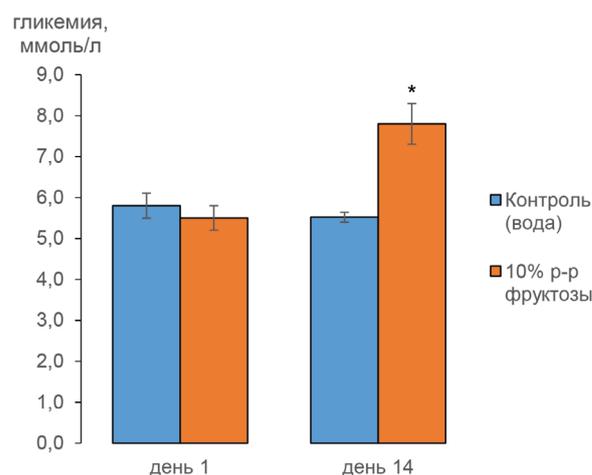


Рис. 2. Базальный уровень гликемии у крыс, находящихся на высокоуглеводной диете ($M \pm SEM$)
Fig. 2. Basal glycemic level in rats on a high-carbohydrate diet ($M \pm SEM$)

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (вода).
 Note: * — $p < 0,05$ compared to the control (water).

Источник: Иванов С.В. и соавт., 2023 г.
 Source: Ivanov SV et al., 2023

Таблица 1

Динамика базального уровня гликемии у крыс со стрептозотоцин-индуцированным СД, находящихся на высокоуглеводной диете (M±SEM)

Table 1

Dynamics of basal glycemic level in rats with streptozotocin-induced diabetes on a high-carbohydrate diet (M±SEM)

Группа	Уровень гликемии, ммоль/л (M±SEM) по дням эксперимента			
	21	28	35	42
Контроль (вода)	5,8±0,3	5,5±0,1	5,6±0,1	6,0±0,3
10 % p-p фруктозы	8,2±0,9*	8,5±1,4*	7,9±1,6*	8,6±1,5*
Контроль (вода) + СТЗ	13,2±1,3^	15,1±2,1^	14,0±1,8^	13,3±2,3^
10 % p-p фруктозы + СТЗ	22,9±1,8+	22,3±1,6+	19,8±1,5+	20,8±1,3+

Примечания: * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (вода); ^ — $p < 0,01$ по сравнению с контролем (вода); + — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (вода) + СТЗ.

Notes: * — $p < 0.05$ compared to the control (water); ^ — $p < 0.01$ compared to the control (water); + — $p < 0.05$ compared to the control (water) + STZ.

В дальнейшем этот разница увеличивалась, что может быть связано со сниженным потреблением корма: если крысы контрольной группы съедали в среднем $25,2 \pm 0,7$ г/крысу/сут корма, то крысы, получавшие фруктозу — $17,5 \pm 0,9$ г/крысу/сут ($p < 0,05$).

2. Влияние высокоуглеводной диеты на развитие стрептозотоцинового диабета. Введение животным на 15-й день эксперимента СТЗ в дозе 35 мг/кг вызывает развитие гипергликемии, при этом базальный уровень глюкозы в крови у животных, предварительно находившихся на высокоуглеводной диете, был в 1,7 раз выше такового в группе крыс, получавших воду (табл. 1). С развитием СД эта разница сокращалась, однако уровень гликемии у СТЗ животных, получавших раствор фруктозы, был достоверно выше группы, в которой в качестве питья использовалась вода.

Установлено, что животные обеих СТЗ групп значительно теряли в массе, что является характерным эффектом данного диабетогенного токсина. Прирост массы за 6 недель эксперимента у животных, получивших СТЗ, был $6,2 \pm 3,6$ г (стандартная диета) и $-8,3 \pm 3,2$ г (высокоуглеводная диета), тогда как у контрольных групп эта разница составила $110,7 \pm 8,1$ г (стандартная диета) и $42,3 \pm 6,2$ г (высокоуглеводная диета). Изменение массы животных соответствует динамике потребления корма: крысы, находящиеся на фруктозной диете, потребляли в среднем вдвое меньше корма, чем контрольные.

3. Влияние высокоуглеводной диеты на толерантность к глюкозной нагрузке. Содержание крыс на высокоуглеводной диете способствует нарушению толерантности к глюкозе на 14-й день эксперимента: площадь под кривой глюкозной нагрузки достоверно выше таковой у контрольных животных (рис. 3), что говорит о развитии инсулинорезистентности. В течение последующих недель инсулинорезистентность у животных, получавших фруктозу, незначительно увеличивается.

Введение СТЗ также способствует нарушению толерантности к глюкозной нагрузке, при этом у животных, находящихся на высокоуглеводной диете, площадь под кривой глюкозной нагрузки на 67 % больше, чем у животных, получавших воду (рис. 3). Гликемия выше 16 ммоль/л в сочетании с инсулинорезистентностью позволяют охарактеризовать полученную модель как СД 2 типа [8].

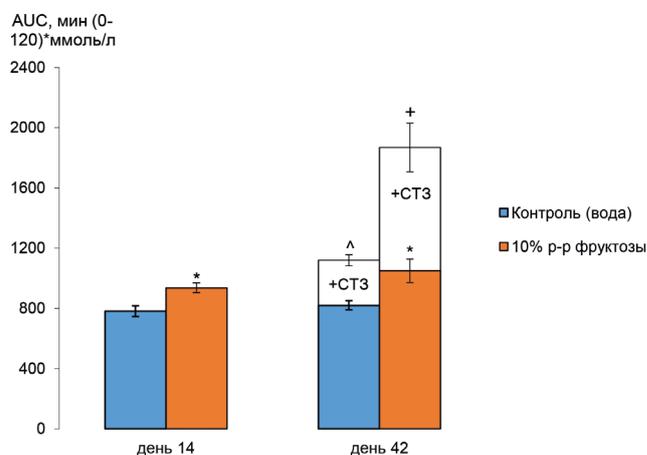


Рис. 3. Влияние СТЗ на толерантность к глюкозе у крыс, находящихся на высокоуглеводной диете (M±SEM)

Fig. 3. The effect of STZ on glucose tolerance in rats on a high-carbohydrate diet (M±SEM)

Источник: Иванов С.В. и соавт., 2023 г.

Source: Ivanov SV et al., 2023

Примечания: * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (вода); ^ — $p < 0,05$ по сравнению с контролем (вода); + — $p < 0,01$ по сравнению с контролем (вода) + СТЗ.

Notes: * — $p < 0.05$ compared to the control (water); ^ — $p < 0.05$ compared to the control (water); + — $p < 0.01$ compared to the control (water) + STZ.

Обсуждение / Discussion

В данном исследовании показано влияние высокоуглеводной диеты в сочетании с СТЗ в подпороговой дозе 35 мг/кг на развитие экспериментального СД 2 типа. Выбор фруктозы в качестве вещества, вызывающего развитие гипергликемии и нарушение толерантности к глюкозной нагрузке, обусловлен её широким распространением в качестве подсластителя [10] и биохимическими свойствами. Известно, что фруктоза всасывается в системный кровоток посредством переносчиков GLUT2 и GLUT5 и метаболизируется в печени с образованием глюкозы, лактата, триглицеридов, свободных жирных кислот, мочевой кислоты [11].

Важно отметить, что метаболизм фруктозы в значительной степени отличается от метаболизма глюкозы, поскольку основные ферменты, участвующие в окислении фруктозы, — кетогексокиназа и альдолаза — не ингибируются инсулином и продуктами реакций — глицеральдегид-3-фосфатом и дигидроксиацетонфосфатом, в то время как ключевой фермент гликолиза — фосфофруктокиназа — блокируется АТФ и цитратом. В результате высокой скорости окисления фруктозы при её метаболизме высвобождается большое количество атомов углерода, являющихся субстратом для синтеза жирных кислот *de novo*. Это объясняет тот факт, что на фоне введения фруктозы экспериментальным животным в сравнении с использованием аналогичных доз глюкозы липогенез многократно возрастает [12]. Кроме того, избыток фруктозы опосредованно снижает скорость окисления жирных кислот, поскольку малонил-КоА, продукт липогенеза, ингибирует ключевые ферменты β-окисления [13].

Увеличение синтеза жирных кислот в сочетании с замедлением процессов их окисления ведут к гиперлипидемии, которая усиливает инсулинорезистентность за счёт активации фосфорилирования субстратов рецепторов инсулина (IRS1 и IRS2), способствуя его деградации и ослаблению взаимодействия инсулина с рецептором [14, 15]. Гиперлипидемия оказывает токсическое действие на панкреатические β-клетки [16].

Кроме того, избыток фруктозы ведёт к непосредственному снижению количества IRS1 и IRS2, а также к сокращению уровня их кодирующих мРНК, что нарушает функционирование инсулиновых рецепторов [17].

Важным аспектом негативного влияния высоких доз фруктозы является активация печёночных JNK-киназа, вовлечённых в каскад воспалительных реакций. Это ведёт к индукции провоспалительных цитокинов TNFα, IL-1β, IL-6, развитию оксидативного стресса в

эндоплазматическом ретикулуме и мисфолдингу протеинов, участвующих в функционировании митохондрий [18]. Энергетический дисбаланс клеток, в первую очередь гепатоцитов, возникает также в результате истощения запасов АТФ: скорость перехода фруктозы в фруктозо-1-фосфат в 10 раз выше, чем у глюкозы в аналогичной реакции [19]. Высвобождающиеся в результате реакций фосфорилирования фруктозы молекулы АДФ и АМФ являются субстратом для синтеза мочевой кислоты, что вызывает гиперурикемию [20].

Таким образом, избыток фруктозы приводит к развитию инсулинорезистентности, дефициту АТФ, накоплению провоспалительных цитокинов и усилению оксидативного стресса [21]. Эти факторы способствуют усилению диабетогенного эффекта СТЗ.

Использование в настоящей работе диеты, основанной на замене питьевой воды 10 % раствором фруктозы в течение 6 недель, позволяет воспроизвести модель СД 2, сочетающую в себе комплекс метаболических нарушений. Синергизм диеты, основанной на применении фруктозы и диабетогенного токсина СТЗ, проявляется в формировании выраженной инсулинорезистентности, что связано не только с прямым цитотоксическим действием СТЗ в отношении β-клеток и снижением продукции инсулина, но и с перегрузкой организма фруктозой, способствующей снижению чувствительности к инсулину.

Заключение / Conclusion

Поскольку применение высокоуглеводной диеты в сочетании с СТЗ в низких дозах воспроизводит основные механизмы развития СД 2 типа у человека, представляется целесообразным использовать эту модель для проведения доклинического исследования потенциальных антидиабетических препаратов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов при подготовке данной статьи.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest in the preparation of this article.

Участие авторов. Иванов С. В. — выполнение эксперимента, обработка результатов; Островская Р. У. — разработка дизайна, написании текста статьи.

Participation of authors. Ivanov SV — experiment execution, results processing; Ostrovskaya RU — design development, writing the text of the article.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Иванов Сергей Витальевич

Автор, ответственный за переписку

e-mail: ivanov-sv-tver@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0438-9108>

к. б. н., с. н. с. лаборатории психофармакологии
ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Заку-
сова», Москва, Российская Федерация

Sergei V. Ivanov

Corresponding author

e-mail: ivanov-sv-tver@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0438-9108>

PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher
at the Laboratory of Psychopharmacology FSBI
“Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow,
Russian Federation

Островская Рита Ушеровна

e-mail: rita.ostrovskaya@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3654-6182>

д. м. н., гл. н. с. лаборатории
психофармакологии ФГБНУ «НИИ
Фармакологии имени В.В. Закусова», Москва,
Российская Федерация

Rita U. Ostrovskaya

e-mail: rita.ostrovskaya@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3654-6182>

Dr. Sci (Med.), Chief Researcher of the Laboratory
of Psychopharmacology FSBI “Zakusov Institute of
Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Lenzen S. Animal models of human type 1 diabetes for evaluating combination therapies and successful translation to the patient with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2017 Oct;33(7):1–13. DOI: 10.1002/dmrr.2915.
2. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2005 Apr;22(4):359–370. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x.
3. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015 Sep 1;70:5.47.1–5.47.20. DOI: 10.1002/0471141755.ph0547s70.
4. Rais N, Véd A, Ahmad R, Parveen K, Gautam GK, Bari DG, Shukla KS, Gaur R, Singh AP. Model of Streptozotocin-nicotinamide Induced Type 2 Diabetes: a Comparative Review. *Curr Diabetes Rev*. 2022;18(8): e171121198001. DOI: 10.2174/157339981866621117123358.
5. Ostrovskaya RU, Ivanov SV, Gudasheva TA, Seredenin SB. A Novel Dipeptide NGF Mimetic GK-2 Selectively Activating the PI3K/AKT Signaling Pathway Promotes the Survival of Pancreatic β -Cells in a Rat Model of Diabetes. *Acta Naturae*. 2019 Jan-Mar;11(1):48–57. DOI: 10.32607/20758251-2019-11-1-48-57.
6. Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю., и др. Сахарный диабет 2 типа у взрослых. *Сахарный диабет*. 2020;23(2S):4–102. [Dedov II, Shestakova MV, Mayorov AY, et al. Diabetes mellitus type 2 in adults. *Diabetes mellitus*. 2020;23(2S):4–102. (In Russ).]. DOI: 10.14341/DM12507.
7. Sasase T, Pezzolesi MG, Yokoi N, Yamada T, Matsumoto K. Animal models of diabetes and metabolic disease. *J Diabetes Res*. 2013;2013:281928. DOI: 10.1155/2013/281928.
8. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В., Шафеев М.А. Влияние агониста рецептора GPR119 на уровень глюкозы, массу тела и потребление пищи у животных с ожирением, обусловленным высокожировой и углеводной диетой. *Проблемы эндокринологии*. 2016;62(1):44–49. [Tyurenkov IN, Kurkin DV, Bakulin DA, Volotova EV, Chafeev MA. The influence of novel GPR119 agonist on body weight, food intake and glucose metabolism in obesity rats provoked high-fat and -carbohydrate diet. *Problemy Endokrinologii*. 2016;62(1):44–49. (In Russ).]. DOI: 10.14341/probl201662144-49.
9. Ivanov SV, Ostrovskaya RU, Koliashnikova KN, et al. Low molecular weight NGF mimetic GK-2 normalizes the parameters of glucose and lipid metabolism and exhibits a hepatoprotective effect on a prediabetes model in obese Wistar rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2022 Oct;49(10):1116–1125. DOI: 10.1111/1440-1681.13693.
10. Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2018 Feb 1;128(2):545–555. DOI: 10.1172/JCI96702.
11. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*. 2009 May;119(5):1322–1334. DOI: 10.1172/JCI37385.
12. Chong MF, Fielding BA, Frayn KN. Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr*. 2007 Jun;85(6):1511–1520. DOI: 10.1093/ajcn/85.6.1511.
13. Ohashi K, Munetsuna E, Yamada H, et al. High fructose consumption induces DNA methylation at PPAR α and CPT1A promoter regions in the rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Dec 4–11;468(1–2):185–9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.134.
14. Baena M, Sangüesa G, Dávalos A, et al. Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues. *Sci Rep*. 2016 May 19;6:26149. DOI: 10.1038/srep26149.
15. Perry RJ, Camporez JG, Kursawe R, et al. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell*. 2015 Feb 12;160(4):745–758. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.012.
16. Kato T, Shimano H, Yamamoto T, et al. Palmitate impairs and eicosapentaenoate restores insulin secretion through regulation of SREBP-1c in pancreatic islets. *Diabetes*. 2008 Sep;57(9):2382–2392. DOI: 10.2337/db06-1806.
17. Catena C, Giacchetti G, Novello M, et al. Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2003 Nov;16(11 Pt 1):973–978. DOI: 10.1016/s0895-7061(03)01002-1.
18. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Jan 1;6(1):a009191. DOI: 10.1101/cshperspect.a009191.
19. Asipu A, Hayward BE, O'Reilly J, Bonthron DT. Properties of normal and mutant recombinant human ketohexokinases and implications for the pathogenesis of essential fructosuria. *Diabetes*. 2003 Sep;52(9):2426–32. DOI: 10.2337/diabetes.52.9.2426.
20. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Mar;290(3):F625–31. DOI: 10.1152/ajprenal.00140.2005.
21. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Sentürk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2013 Feb 28;19(8):1166–1172. DOI: 10.3748/wjg.v19.i8.1166.

Методика количественного анализа маркерного субстрата ABCB1-белка фексофенадина в лизате клеток Caco-2

© Копаница М. А., Транова Ю. С., Черных И. В., Шулькин А. В., Мыльников П. Ю.,
Калинкина О. В., Якушева Е. Н.

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

Аннотация. Один из способов анализа активности ABCB1-белка — это оценка накопления его субстрата фексофенадина (Ф.) внутри тест-клеток. **Цель** — разработка и валидация методики количественного анализа Ф. в лизате клеток Caco-2 с помощью ВЭЖХ-МС/МС. **Материалы и методы.** В качестве матрицы использовался лизат клеток Caco-2. Анализ выполняли на хроматографе «Ultimate 3000» с тройным квадрупольным масс-детектором TSQ Fortis, колонкой UCT Selectra C18 4,6 мм×100 мм 5 мкм в градиентном режиме элюирования. Скорость подвижной фазы — 0,3 мл/мин, объем пробы — 20 мкл, режим ионизации — положительный, внутренний стандарт — амантадин (нг/мл). Пробоподготовка — осаждение белка лизата клеток ацетонитрилом. Методику валидировали по параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения (НПКО), правильность, прецизионность, перенос пробы и стабильность образцов. **Результаты.** На хроматограммах холостого лизата клеток Caco-2 не было пиков со временем удерживания, характерным для Ф. (5,70 мин) и амантадина (3,58 мин). НПКО Ф. составил 0,5 нг/мл. Перенос Ф. не превышал 20 % НПКО, а амантадина — 5 %. По результатам анализа трёх серий градуировочных стандартов (0,5; 1; 1,5; 5; 10; 25; 40; 50 нг/мл) получены уравнения линейной регрессии, коэффициенты корреляции превышали 0,99. Правильность и прецизионность оценивали внутри и между циклами, выполняя анализ растворов Ф. в матрице (0,5; 1,5; 25 и 40 нг/мл) в рамках трёх циклов. Параметры не превышали 20 % для НПКО и 15 % — для остальных точек. Стабильность растворов Ф. (1,5 и 40 нг/мл) в лизате анализировали при хранении при комнатной температуре, после 3-кратной заморозки–разморозки, хранении при -80 °С 60 сут., после пробоподготовки и нахождения в автосемплере 24 ч. Правильность находилась в пределах 15 % от номинальных значений. **Выводы.** Разработана и валидирована методика количественного определения Ф. в лизате клеток Caco-2 с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС; фексофенадин; ABCB1-белок; лизат клеток Caco-2

Для цитирования:

Копаница М. А., Транова Ю. С., Черных И. В., Шулькин А. В., Мыльников П. Ю., Калинкина О. В., Якушева Е. Н. Методика количественного анализа маркерного субстрата ABCB1-белка фексофенадина в лизате клеток Caco-2. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(2):60–68. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-60-68>

Поступила: 25 марта 2023 г. **Принята:** 30 марта 2023 г. **Опубликована:** 30 июня 2023 г.

Method for quantitative analysis of the marker substrate ABCB1-protein fexofenadine in Caco-2 cell lysate

© Maria A. Kopanitsa, Yulia S. Tranova, Ivan V. Chernykh, Alexey V. Shchulkin, Pavel Yu. Mylnikov, Oksana V. Kalinkina, Elena N. Yakusheva
Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

Abstract. One way to analyze the activity of the ABCB1 protein is to assess the accumulation of its substrate fexofenadine (F.) inside the test cells. **The goal** is to develop and validate a method for the quantitative analysis of F. in Caco-2 cell lysate using HPLC-MS/MS. **Materials and methods.** Caco-2 cell lysate was used as a matrix. The analysis was performed on an "Ultimate 3000" chromatograph with a TSQ Fortis triple quadrupole mass detector, a UCT Selectra C18 4.6 mm*100 mm 5 µm column in a gradient elution mode. The mobile phase rate was 0.3 ml/min, the sample volume was 20 µl, the ionization mode was positive, and the internal standard was amantadine (ng/ml). Sample preparation — precipitation of cell lysate protein with acetonitrile. The method was validated for the following parameters: selectivity, linearity, lower limit of quantitation (LLOQ), correctness, precision, sample transfer and sample stability. **Results.** Chromatograms of the blank lysate of Caco-2 cells showed no peaks with retention times characteristic of F. (5.70 min) and amantadine (3.58 min). NPKO F. was 0.5 ng/ml. F.'s transfer did not exceed 20% of NPKO, and amantadine — 5%. Based on the results of the analysis of three series of calibration standards (0.5; 1; 1.5; 5; 10; 25; 40; 50 ng/ml), linear regression equations were obtained, the correlation coefficients exceeded 0.99. Accuracy and precision were assessed within and between cycles by analyzing F. solutions in the matrix (0.5; 1.5; 25 and 40 ng/ml) within three cycles. The parameters did not exceed 20% for LLPO and 15% for other points. The stability of F. solutions (1.5 and 40 ng/ml) in the lysate was analyzed during storage at room temperature, after 3-fold freezing-thawing, storage at -80 °C for 60 days, after sample preparation and being in the autosampler for 24 hours. The accuracy was within 15% of the nominal values. **Conclusions.** A method for the quantitative determination of F. in Caco-2 cell lysate using HPLC-MS/MS has been developed and validated.

Keywords: HPLC-MS/MS; fexofenadine; ABCB1 protein; Caco-2 cell lysate

For citations:

Kopanitsa MA, Tranova YuS, Chernykh IV, Shchulkin AV, Mylnikov PYu, Kalinkina OV, Yakusheva EN.

Method for quantitative analysis of the marker substrate ABCB1-protein fexofenadine in Caco-2 cell lysate. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(2):60–68. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-60-68>

Received: March 25, 2023. **Accepted:** March 30, 2023. **Published:** June 30, 2023.

Введение / Introduction

АВСВ1-белок представляет собой АТФ-зависимый мембранный транспортёр, принадлежащий к суперсемейству АВС-транспортёров (Adenosine-Binding-Cassete), функционирующий как насос, удаляющий из клеток во внеклеточное пространство липофильные вещества эндогенной и экзогенной природы. Спектр его субстратов включает порядка 50 % современных лекарственных средств различных фармакологических групп [1]. В связи с вариабельной активностью, которая может изменяться под действием различных факторов, в том числе в результате приёма лекарственных средств, актуальной является оценка эффлюксной активности АВСВ1-белка для прогнозирования возможных межлекарственных взаимодействий. Кроме того, подобный анализ позволит осуществлять поиск веществ с ингибирующим потенциалом по отношению к транспортёру с перспективой их дальнейшего применения при патологиях, в основе патогенеза которых лежит его гиперактивность (множественная лекарственная устойчивость опухолей, резистентная к фармакотерапии эпилепсия и др. [2]).

На сегодняшний день утверждены отечественные [3] и зарубежные рекомендации [4, 5], предписывающие тестирование всех вновь разрабатываемых лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам АВСВ1-белка. Причём на первом этапе анализ проводится *in vitro* (путём оценки транспорта маркерных субстратов белка, таких как фексофенадин, дигоксин, домперидон и др. средств, на гиперэкспрессирующих его клеточных культурах), а в случае положительных результатов — *in vivo* (анализируется фармакокинетика маркерных субстратов транспортёра на животных и в клинических исследованиях).

Фексофенадин — блокатор H1-гистаминовых рецепторов III поколения, внутриклеточное проникновение которого контролируется АВСВ1-белком [4]. В этой связи интенсивность его накопления в клетках может характеризовать функциональную активность транспортёра. Суть эксперимента по анализу влияния лекарственных веществ на активность АВСВ1-белка *in vitro* сводится к исследованию количества фексофенадина, которое проникло внутрь клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Сасо-2, которые после 21-дневной инкубации на плоской подложке спонтанно дифференцируются в культуру, подобную эпителиоцитам тонкого кишечника с повышенным содержанием транспортёра на апикальных мембранах [6]. Оценка количества фексофенадина проводится в клеточном лизате — в контроле (после инкубации с веществом в течение определённого времени) и на фоне добавления в среду инкубации потенциального ингибитора белка-транспортёра.

Продemonстрированная насыщаемость АВСВ1-белка [7] диктует необходимость добавления фексофенадина в питательную среду в относительно низ-

кой концентрации (по нашим данным, до 300 мкМ). Степень внутриклеточного накопления вещества незначительна. Таким образом, анализ количества фексофенадина внутри клетки требует применения высокочувствительной методики. В свою очередь большое количество балластных веществ в клеточном лизате объясняет повышенные требования к её селективности. Указанным требованиям удовлетворяет высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с масс-детектированием.

Целью / Aim исследования явилась разработка и валидация методики количественного анализа фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы / Materials and methods

В качестве матрицы для разработки и валидации методики использовался лизат клеток Сасо-2 после их культивирования на плоской подложке (в лунках 6-луночного планшета) в течение 21 дня [6]. Приготовление лизата производили следующим образом: клетки с одной лунки снимали раствором трипсин-ЭДТА, трижды промывали 1 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,2) с последующим центрифугированием при 1500 g в течение 5 минут, затем лизировали с помощью цикла трёхкратной заморозки/разморозки в 350 мкл буферного раствора.

В качестве стандарта при разработке методики использовали субстанцию фексофенадина гидрохлорида (United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, США). Структурная формула вещества и фрагментация его молекулы представлены на рис. 1.

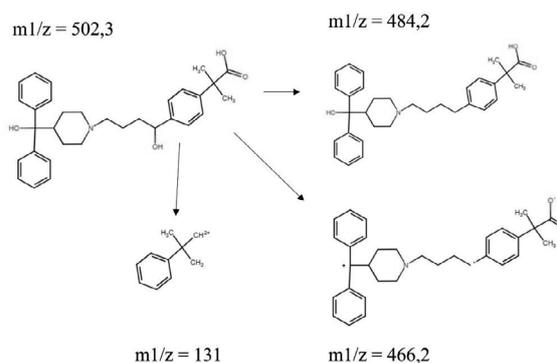


Рис. 1. Структурная формула фексофенадина и фрагментация его молекулы

Fig. 1. Structural formula of fexofenadine and fragmentation of its molecule

Матричный раствор фексофенадина готовили с концентрацией 1 мг/мл в метаноле и хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Рабочие растворы (с концентрациями 5; 10; 15; 50; 100; 250; 400; 500 нг/мл) готовили из матричного путём его разбавления метанолом.

Градуировочные стандарты с концентрациями 0,5; 1; 1,5; 5; 10; 25; 40; 50 нг/мл и образцы для контроля качества с концентрациями 0,5; 1,5; 25; 40 нг/мл готовили разведением рабочих растворов матрицей. Аналитический диапазон методики выбирали на основе концентраций, ожидаемых в исследовании на указанной клеточной линии.

В качестве внутреннего стандарта использовали амантадин (амантадин гидрохлорид, United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, США) в концентрации 10 нг/мл, для этого к 49950 мкл ацетонитрила добавляли 50 мкл раствора амантадина в метаноле с концентрацией 10 мкг/мл.

Количественный анализ выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США), оснащённом автосемплером, дегазатором, градиентным насосом и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США). Управление системой и математическую обработку данных проводили с помощью программы «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)».

Использовали обращённо-фазную хроматографическую колонку UCT Selectra C18 4,6 мм×100 мм 5 мкм, 100 А и предколонку Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM.

Применялся градиентный режим элюирования смесью раствора муравьиной кислоты 0,1 % в воде для ВЭЖХ и ацетонитрила (табл. 1). Скорость подвижной фазы составила 0,3 мл/мин при температуре 35 °С, объём вводимой пробы — 20 мкл.

Таблица 1

Соотношение компонентов подвижной фазы по объёму

Table 1

Ratio of mobile phase components by volume

Время	Раствор муравьиной кислоты 0,1 %	Ацетонитрил
0 мин	75 %	25 %
0,2 мин	30 %	70 %
6 мин	1 %	99 %
8 мин	75 %	25 %

Время одного анализа составляло 10 мин, время удерживания фексофенадина соответствовало $5,70 \pm 0,091$ мин. Для приготовления подвижной фазы применяли следующие реактивы: вода ВЭЖХ-МС («VWR», №21F104014; Франция), кислота муравьиная 98 % для аналитики («Panreac», №0001900259; Испания), ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ («Химмед», Россия).

Молекулы фексофенадина ионизировали в положительном режиме на электроспрее при напряжении 3500 В; скорость потока оболочечного газа (sheath gas) составляла 50 Arb, вспомогательного газа (aux

gas) — 10 Arb, продувочного газа (sweep gas) — 1 Arb, температура трубки для переноса ионов — 300 °С, температура испарителя — 350 °С. Для детектирования фексофенадина использовали следующие переходы масс: 502,3 m/z → 131 m/z при энергии столкновения 42 В, 502,3 m/z → 466,2 m/z при энергии столкновения 27 В и 502,3 m/z → 484,2 m/z при энергии столкновения 22 В, фрагментация источника 5, CID gas 1,5 mTorr. Переходы масс для амантадина 152,1 m/z → 79,08 m/z при энергии столкновения 33 В и 152,1 m/z → 135,08 m/z при энергии столкновения 17 В.

Пробоподготовка заключалась в осаждении белка и других высокомолекулярных веществ матрицы ацетонитрилом. Для этого к 300 мкл пробы клеточного лизата добавляли 300 мкл ацетонитрила с внутренним стандартом в концентрации 10 нг/мл, перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия), центрифугировали на центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter («Beckman Coulter», США) при 25000 г в течение 10 мин при температуре 4 °С.

Для расчёта метрологических характеристик и основных валидационных параметров разработанной методики применяли программы «Statistica 13.0» и «Microsoft Excel». Биоаналитическую методику валидировали по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, правильность (на уровнях внутри цикла, между циклами), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами), матричный эффект, перенос пробы и стабильность образцов в соответствии с Руководством по экспертизе лекарственных средств, Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 №85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза», Bioanalytical method validation. Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2018 и Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London; 2011.

Результаты / Results

Селективность (избирательность) разработанной методики определяли, анализируя 6 холостых проб лизата клеток Сасо-2 без добавления стандарта фексофенадина и внутреннего стандарта и образцы лизата с добавлением фексофенадина с концентрацией 50 нг/мл и внутреннего стандарта с концентрацией 10 нг/мл. На хроматограммах образцов холостого клеточного лизата не наблюдали пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания фексофенадина и амантадина (рис. 2—4).

Влияние (эффект) переноса оценивали, анализируя холостой образец лизата клеток Сасо-2 после инъекции пробы с фексофенадином с концентрацией

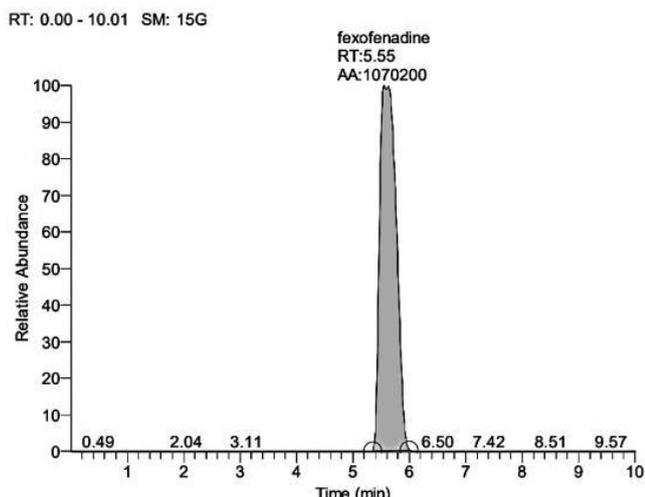


Рис. 2. Хроматограмма лизата клеток Caco-2 с добавлением фексофенадина с концентрацией 50 нг/мл
Fig. 2. Chromatogram of Caco-2 cell lysate with the addition of fexofenadine at a concentration of 50 ng/ml

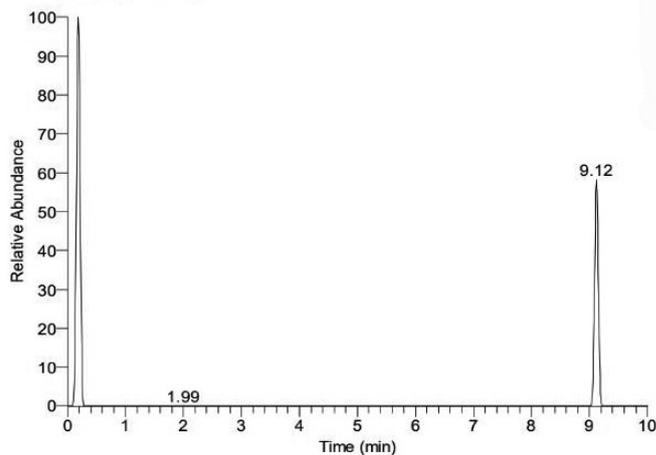


Рис. 4. Хроматограмма лизата клеток Caco-2 без добавления фексофенадина и амантадина
Fig. 4. Chromatogram of Caco-2 cell lysate without addition of fexofenadine and amantadine

Примечания: RT (retention time) — время удерживания; AA (automatic area) — площадь пика.
Notes: RT — retention time; AA — automatic area.

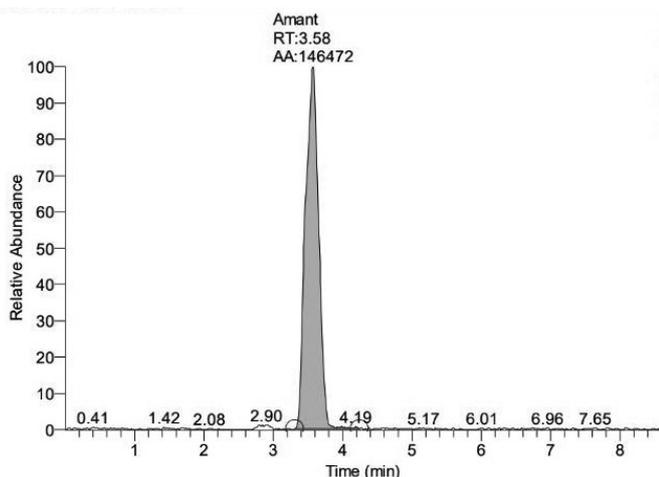


Рис. 3. Хроматограмма лизата клеток Caco-2 с добавлением раствора амантадина с концентрацией 10 нг/мл
Fig. 3. Chromatogram of Caco-2 cell lysate with the addition of amantadine solution with a concentration of 10 ng/ml

Примечания: RT (retention time) — время удерживания; AA (automatic area) — площадь пика.
Notes: RT — retention time; AA — automatic area.

50 нг/мл и амантадина с концентрацией 10 нг/мл. На хроматограмме холостого образца клеточного лизата перенос фексофенадина не превышал 20 % величины нижнего предела количественного определения (НПКО) и 5 % — для внутреннего стандарта.

Нижний предел количественного определения (НПКО) фексофенадина в лизате клеток Caco-2 составил 0,5 нг/мл. При этом сигнал фексофенадина из образца с НПКО превосходил более чем в 5 раз величину сигнала холостого образца, а правильность и прецизионность определения не превышали 20 %.

Градуировочную кривую строили, анализируя 8 градуировочных стандартов, представляющих собой образцы лизата клеток Caco-2 с добавлением рабочих растворов фексофенадина до получения концентраций 0,5; 1; 1,5; 5; 10; 25; 40; 50 нг/мл. С помощью полученных значений были построены калибровочные графики зависимости площади пика от концентрации вещества (образец одного из графиков приведён на рис. 5).

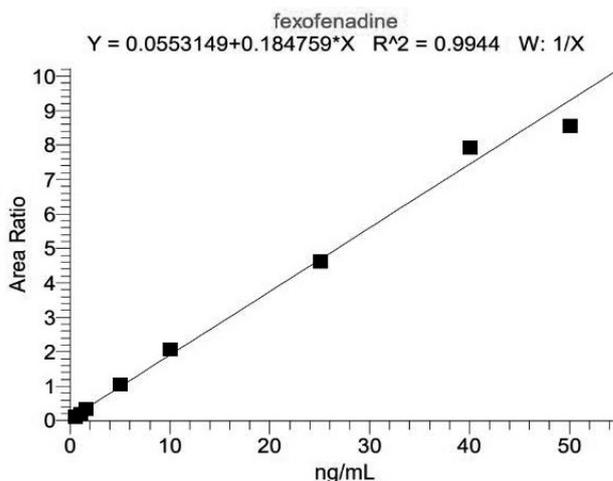


Рис. 5. Образец калибровочного графика зависимости «концентрация фексофенадина — площадь пика»
Fig. 5. Sample calibration graph of the dependence "fexofenadine concentration — peak area"

По результатам анализа трёх серий градуировочных стандартов были получены уравнения линейной регрессии:

Таблица 2

Отклонения концентраций градуировочных стандартов фексофенадина от их номинальных значений

Table 2

Deviations of concentrations of fexofenadine calibration standards from their nominal values

Концентрация номинальная, нг/мл	Серия 1		Серия 2		Серия 3	
	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Точность, %
0,500	0,523	4,5	0,584	16,8	0,428	14,3
1,000	0,948	5,2	0,917	8,3	0,893	10,7
1,500	1,521	1,4	1,619	7,9	1,623	8,2
5,000	5,540	10,8	4,872	2,6	5,415	8,3
10,000	9,772	2,3	8,977	10,2	11,026	10,3
25,000	25,873	3,5	22,000	12,0	24,836	0,7
40,000	38,621	3,5	40,748	1,9	42,705	6,8
50,000	50,742	1,5	53,283	6,6	46,074	7,9

$Y = 0,0553149 + 0,184759 \cdot X$ $R^2 = 0,9944$ $W: 1/X$,
 $Y = 0,000945174 + 0,138063 \cdot X$ $R^2 = 0,9991$ $W: 1/X$,
 $Y = 0,0197284 + 0,131622 \cdot X$ $R^2 = 0,9938$ $W: 1/X$.

Полученные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99).

Отклонения концентраций градуировочных стандартов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в табл. 2. Данная таблица дополнительно характеризует линейность и демонстрирует близость каждой точки к калибровочной кривой. Экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных стандартов должны лежать в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений, а для НПКО — в пределах $\pm 20\%$ (табл. 2).

Правильность и прецизионность оценивали, выполняя анализ образцов контролей качества фексофенадина с концентрациями 0,5; 1,5; 25 и 40 нг/мл в рамках трёх циклов: параметры оценивали внутри и между циклами. Полученные величины правильности и прецизионности составили не более 20 % для НПКО и не более 15 % — для остальных точек (табл. 3 и 4).

Матричный эффект оценивали по площади пиков фексофенадина в присутствии лизата клеток Сасо-2 и отдельно в воде с концентрациями 1,5 и 40 нг/мл. Относительное стандартное отклонение эффекта матрицы, взятой из 6 отдельных лунок планшета с клетками линии Сасо-2, не превышало 15 %, средняя точность для образца контроля качества с концентрациями 1,5 и 40 нг/мл составила 6,7 и 3,0 %, соответственно.

Стабильность растворов фексофенадина с концентрациями 1,5 и 40 нг/мл в клеточном лизате анализировали при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, трёхкратной заморозке–разморозке при $-80\text{ }^\circ\text{C}$, при хранении при $-80\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 60 суток, после пробоподготовки и нахождения в автосемплере в течение 24 ч. Выполняли по 3 повтора для каждого вида стабильности. Правильность для каждой концентрации (для средних значений) на-

ходилась в пределах 15 % от номинальных значений (табл. 5).

Обсуждение / Discussion

FDA требует все потенциально выходящие на рынок лекарственные средства подвергать анализу на их возможную принадлежность к субстратам и модуляторам функциональной активности ABCB1-белка [4, 5]. При этом анализ *in vitro* обладает экспрессностью, относительной экономической доступностью, не сопряжён с биоэтическими сложностями и позволяет проводить скрининговый отбор веществ с ингибирующим потенциалом по отношению к транспортёру.

Ведущим методом исследования фармакокинетики лекарственных средств как на доклиническом, так и на клиническом этапах является ВЭЖХ. Причём наиболее селективным и чувствительным методом детектирования считается использование МАСС-детектора [8].

В научной литературе представлен ряд ВЭЖХ-методик количественного анализа фексофенадина. Однако часть из них предполагает использование низкочувствительного УФ-детектора [9, 10], что в нашем случае не позволит детектировать низкое внутриклеточное содержание целевого вещества. Некоторые методики предлагают анализ вещества в биожидкостях [11, 12] или гомогенатах органов [10, 13], что подразумевает более сложную пробоподготовку. Ряд методик с использованием ВЭЖХ-МС/МС при анализе фексофенадина в клеточном лизате обладают более низкой чувствительностью [14].

Предлагаемая нами методика характеризуется чувствительностью, специфичностью, простотой выполнения, высокой разрешающей способностью, воспроизводимостью и линейностью в диапазоне рабочих концентраций. Её применение может быть рекомендовано для оценки внутриклеточного накопления

Таблица 3

Правильность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Caco-2 внутри цикла

Table 3

Correctness and precision of the method of quantitative determination of fexofenadine in Caco-2 cell lysate within the cycle

Концентрация номинальная, нг/мг	Концентрация рассчитанная, нг/мл	Правильность, %	Концентрация средняя, нг/мл	Правильность средняя, %	SD	Прецизионность, %
0,500	0,454	9,2	0,5134	7,7	0,04328	8,4
	0,483	3,4				
	0,528	5,6				
	0,551	10,2				
	0,551	10,2				
1,500	1,723	14,9	1,5532	8,1	0,1551	10,0
	1,714	14,3				
	1,385	7,7				
	1,480	1,3				
	1,464	2,4				
25,000	25,751	3,0	24,9794	1,7	0,6342	2,5
	24,810	0,8				
	24,033	3,9				
	25,029	0,1				
	25,274	1,1				
40,000	37,645	5,9	39,4172	2,3	1,1780	3,0
	39,494	1,3				
	40,111	0,3				
	39,075	2,3				
	40,761	1,9				

Таблица 4

Правильность и прецизионность методики количественного определения фексофенадина в лизате клеток Caco-2 между циклами

Table 4

Correctness and precision of the method of quantitative determination of fexofenadine in Caco-2 cell lysate between cycles

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация, рассчитанная по трём различным уравнениям регрессии, нг/мл	Правильность, %	Концентрация средняя, нг/мл	Правильность средняя, %	SD	Прецизионность, %
0,500	0,513	7,7	0,486	10,8	0,02946	6,1
	0,455	11,2				
	0,489	13,3				
1,500	1,553	8,1	1,472	5,7	0,07741	5,3
	1,464	2,4				
	1,399	6,7				
25,000	24,979	1,8	24,319	5,67	1,9851	8,2
	25,890	3,6				
	22,088	11,6				
40,000	39,417	2,3	38,597	5,3	0,8933	2,3
	37,645	6,5				
	38,728	7,2				

Таблица 5

Правильность при определении стабильности растворов фексофенадина с концентрациями 1,5 и 40 нг/мл

Table 5

Correctness in determining the stability of fexofenadine solutions with concentrations of 1.5 and 40 ng/ml

Условия	Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация средняя, нг/мл	Правильность, %
Хранение при комнатной температуре	1,500	1,427	4,9
	40,000	38,883	3,9
Трёхкратная заморозка–разморозка при –80 °С	1,500	1,607	12,3
	40,000	37,279	4,2
Хранение при –80 °С в течение 60 суток	1,500	1,443	3,8
	40,000	37,446	6,4
После пробоподготовки и нахождения в автоемплере в течение 24 ч	1,500	1,397	6,9
	40,000	36,301	9,3

маркерного субстрата ABCB1-белка фексофенадина при анализе функциональной активности данного белка-транспортера *in vitro* и оценке лекарственных веществ на принадлежность к числу модуляторов его активности.

Заключение / Conclusions

Разработана и валидирована методика количественного определения маркерного субстрата ABCB1-белка — фексофенадина в лизате клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

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

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest, which must be reported in connection with the publication of this article.

Финансирование. Работа поддержана стипендией Президента Российской Федерации молодым учёным и аспирантам (Конкурс СП-2022) (приказ Минобрнауки России от 20.01.2022 №38).

Financing. The work was supported by the scholarship of the President of the Russian Federation for young scientists and postgraduates (SP-2022 Competition) (Order of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. 38 dated 20.01.2022).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Копаница Мария Андреевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: kopanitsa412@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7476-4538>

SPIN-код: 8147-5006

Ассистент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация

Maria A. Kopanitsa

Corresponding author

e-mail: kopanitsa412@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7476-4538>

SPIN code: 8147-5006

Assistant of the Department of Pharmaceutical chemistry RyazSMU, Ryazan, Russian Federation

Транова Юлия Сергеевна

e-mail: yulyatran@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>

SPIN-код: 2732-8760

Ассистент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация

Yulia S. Tranova

e-mail: yulyatran@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5068-1201>

SPIN code: 2732-8760

Assistant of the Department of Pharmaceutical chemistry RyazSMU, Ryazan, Russian Federation

Черных Иван Владимирович

e-mail: ivchernykh88@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>

SPIN-код: 5238-6165

Заведующий кафедрой фармацевтической химии, д.б.н., доц. ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Российская Федерация

Ivan V. Chernykh

e-mail: ivchernykh88@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>

SPIN code: 5238-6165

Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor RyazSMU, Ryazan, Russian Federation

Шулькин Алексей Владимирович

e-mail: alekseishulkin@rambler.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>
 SPIN-код: 2754-1702
 Профессор кафедры фармакологии, д.м.н., доц.
 ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань,
 Российская Федерация

Alexey V. Shchulkin

e-mail: alekseishulkin@rambler.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>
 SPIN code: 2754-1702
 Professor of the Department of Pharmacology,
 Dr. Sci. (Med), Associate Professor RyazSMU,
 Ryazan, Russian Federation

Мыльников Павел Юрьевич

e-mail: pavelmylnikov@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>
 SPIN-код: 8503-3082
 Ассистент кафедры фармакологии, к.б.н.
 ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань,
 Российская Федерация

Pavel Yu. Mylnikov

e-mail: pavelmylnikov@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>
 SPIN code: 8503-3082
 Assistant of the Department of Pharmacology,
 Cand. Sci. (Biol.) RyazSMU, Ryazan, Russian
 Federation

Калинкина Оксана Владимировна

e-mail: kalinkina.oksanka@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4005-4076>
 SPIN-код: 1034-2457
 Старший преподаватель кафедры фармацевти-
 ческой химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава
 России, Рязань, Российская Федерация

Oksana V. Kalinkina

e-mail: kalinkina.oksanka@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4005-4076>
 SPIN code: 1034-2457
 Senior Lecturer, Department of Pharmaceutical
 Chemistry RyazSMU, Ryazan, Russian Federation

Якушева Елена Николаевна

e-mail: enya.rzn@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>
 SPIN-код: 2865-3080
 Заведующий кафедрой фармакологии, д.м.н.,
 проф. ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
 Рязань, Российская Федерация

Elena N. Yakusheva

e-mail: enya.rzn@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>
 SPIN code: 2865-3080
 Head of the Department of Pharmacology,
 Dr. Sci. (Med), Professor RyazSMU, Ryazan,
 Russian Federation

Список литературы / References

1. Spudich A, Kilic E, Xing H, et al. Inhibition of multidrug resistance transporter-1 facilitates neuroprotective therapies after focal cerebral ischemia. *Nat Neurosci.* 2006 Apr;9(4):487–8. DOI: 10.1038/nn1676.
 2. Черных И.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Попова Н.М. Роль гликопротеина-Р в неврологии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2017;117(1):67–71.
 [Chernykh IV, Shchulkin AV, Yakusheva EN, Popova NM. A role of P-glycoprotein in neurology. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova.* 2017;117(1):67–71. (In Russ.). DOI: 10.17116/jnevro20171171167-71.
 3. Сычев Д.А., Кукес В.Г., Каркищенко Н.Н. Методические рекомендации по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных: руководство по экспертизе лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2014. [Sychev DA, Kukes VG, Karkishhenko NN. Metodicheskie rekomendacii po izucheniyu biotransformacii i transporterov novy'x lekarstvenny'x sredstv: dizajn issledovanij, analiz danny'x: rukovodstvo po e'kspertize lekarstvenny'x sredstv. Moscow: Grif i K; 2014. (In Russ.).]

4. Clinical Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Clinical Pharmacology.* (2020).
 5. *In Vitro* Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Clinical Pharmacology.* (2020).
 6. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005 Jan;21(1):1–26. DOI: 10.1007/s10565-005-0085-6.
 7. Шулькин А.В., Транова Ю.С., Абаленихина Ю.В., и др. Клетки линии Caco-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2022;(10):63–69. [Shchulkin AV, Tranova YuS, Abalenikhina YuV, et al. Cells of the Caco-2 line as a model for studying the absorption of medicinal

substances. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;(10):63–69. (In Russ).]. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-206-10-63-69.

8. Pilařová V, Gottvald T, Svoboda P, et al. Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum. *Anal Chim Acta*. 2016 Aug 31;934:252–65. DOI: 10.1016/j.aca.2016.06.008.

9. Oliveira DC, Weigh A, Rolim CM. Simple and reliable HPLC analysis of fexofenadine hydrochloride in tablets and its application to dissolution studies. *Pharmazie*. 2007 Feb;62(2):96–100.

10. Мыльников П.Ю., Черных И.В., Шулькин А.В., Попова Н.М., Якушева Е.Н. ВЭЖХ-методика количественного анализа фексофенадина в печени кроликов. *Фармация и фармакология*. 2020;8(1):40–47. [Myl'nikov PYu, Chernykh IV, Shchulkin AV, Popova NM, Yakusheva EN. HPLC methods of fexofenadine quantitative analysis in rabbits' liver. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(1):40–47. (In Russ).]. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-1-40-47.

11. Якушева Е.Н., Черных И.В., Шулькин А.В., Гацаного М.В. Разработка ВЭЖХ-методики количественного анализа фексофенадина в плазме крови. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2017;(2):35–38. [Yakusheva EN, Chernykh IV, Shulkin AV, Gatsanoga MV. Design of HPLC methods of fexofenadine quantitative analysis in blood plasma. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2017;(2):35–38. (In Russ).].

12. İşleyen EAÖ, Özden T, Özilhan S, Toptan S. Quantitative determination of fexofenadine in human plasma by HPLC-MS. *Chromatographia*. 2007;(66):109–113. DOI: 10.1365/s10337-007-0267-x.

13. Zhao R, Kalvass JC, Yanni SB, Bridges AS, Pollack GM. Fexofenadine brain exposure and the influence of blood-brain barrier P-glycoprotein after fexofenadine and terfenadine administration. *Drug Metab Dispos*. 2009 Mar;37(3):529–35. DOI: 10.1124/dmd.107.019893.

14. Flynn CA, Alnouti Y, Reed GA. Quantification of the transporter substrate fexofenadine in cell lysates by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011 Aug 30;25(16):2361–6. DOI: 10.1002/rcm.5111.