

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

ФАРМАКО КИНЕТИКА и ДИНАМИКА

Включен в перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ



№3.2023



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

Колик Лариса Геннадьевна
д. б. н., профессор РАН, Москва

Колыванов Геннадий Борисович, д. б. н., Москва

Мирзоян Рубен Симонович
заслуженный деятель науки
РФ, д. м. н., профессор, Москва

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 30.09.2023 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 6. Бета-блокаторы
Мокров Г. В. 3

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Фармакокинетика димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 у крыс. Часть 1. Однократное и многократное внутрисосудистое и внесосудистое введение. Проверка гипотезы линейности фармакокинетики
Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Бочков П. О., Поварнина П. Ю., Жердев В. П. 12

Сопоставление приёмов расчёта фармакокинетических параметров в исследованиях с дизайном «животное-точка»
Косман В. М., Карлина М. В., Макарова М. Н., Макаров В. Г. 19

Количественное определение циклического гуанозинмонофосфата (ц-ГМФ) в тканях крыс с помощью жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии
Попов Н. С., Балабаньян В. Ю., Колгина Н. Ю., Петров Г. А., Донсков С. А., Атаджанов И. Б. 28

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Фармакологическая активность лактата кальция на модели дисбактериоза у крыс
Полюга Н. Л., Трофимец Е. И., Боровкова К. Е., Никифорова Л. Р., Салмова Ю. В., Пелешок А. А., Крышень К. Л., Макарова М. Н., Колодкин А. М., Митерева Д. Е., Касаткина И. С. 39

Нейропептид цикло-L-пролилглицин противодействует скополамин-индуцированному нарушению долговременной памяти у крыс в тесте «Распознавание нового объекта»
Воронцова О. Н., Аляева А. Г., Колясникова К. Н., Вальдман Е. А., Поварнина П. Ю. 50

Особенности антиаритмического действия соединения АЛМ-802
Барчуков В. В., Зинченко В. П., Цорин И. Б., Теплов И. Ю., Столярук В. Н., Вититнова М. Б., Мокров Г. В., Крыжановский С. А. 56

Исследование поведенческих эффектов новых фосфорилированных тиосемикарбазидов в эксперименте
Никитина А. В., Семина И. И., Никитин Д. О., Гаврилова Е. Л., Бурангулова Р. Н., Крутов И. А., Исаева А. О. 68

Антидепрессивная активность производного пиррола[1,2a][1,4]диазепина ГМАЛ-24 в тесте вынужденного плавания у мышей
Королев А. О., Волкова А. В., Козин Я. С., Мокров Г. В., Воронина Т. А., Калинина Т. С. 77

Изучение взаимосвязи между тяжестью течения алкогольной кардиомиопатии и уровнем потребления алкоголя у самцов и самок крыс на модели «бытового пьянства»
Крыжановский С. А., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Барчуков В. В., Столярук В. Н., Вититнова М. Б., Колик Л. Г., Дурнев А. Д. ... 82

ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Изучение фармакокинетического профиля лекарственного препарата Гидазепам®, таблетки, 50 мг в исследовании биоэквивалентности
Баскаков Е. В., Григорьев А. В., Глобенко А. А., Шмелев А. Г., Колмыкова Е. А., Ястребова А. В., Сидорова А. А., Капашин А. В., Ковчан О. В., Башкатова А. И., Пасько М. А. 94



Chief editor

Vladimir P. Zherdev

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

Deputy chief editor

Valery V. Smirnov

Ph.D., Moscow

Executive secretary

Alexander A. Litvin

Ph.D., Moscow

EDITORIAL BOARD

Irina B. Bondareva

Ph.D., Moscow

Tatiana A. Voronina

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

Olga A. Gromova

Ph.D., Professor, Ivanovo

Andrey D. Durnev

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

Georgiy I. Kovalev

Ph.D., Professor, Moscow

Larisa G. Colic

Ph.D., Professor, Moscow

Gennady B. Kolyvanov

Ph.D., Moscow

Ruben S. Mirzoyan

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

Igor I. Miroshnichenko

Ph.D., Moscow

Alla V. Rudakova

Ph.D., Professor, St. Petersburg

Galina V. Ramenskaya

Ph.D., Professor, Moscow

Abrek K. Sariev

Ph.D., Professor, Moscow

Alexander A. Spasov

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Moscow

Alex K. Starodubtsev

Ph.D., Professor, Moscow

Dmitry A. Sychev

Academician RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Ivan N. Tyurenkov

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

Alexander L. Khokhlov

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Yaroslavl

ISSUING GROUP

Dmitry Yu. Belousov

Managing Editor

+7 (910) 449-22-73

e-mail: clinvest@mail.ru

Elena V. Afanaseva

CEO in LLC «Publishing OKI»
subscription

+7(916)986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

site: www.izdat-oki.ru

Elena V. Zhuk

Design and layout

e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 30.09.2023 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 6. Beta blockers

Mokrov GV 3

PRECLINICAL PHARMACOKINETICS STUDIES

Pharmacokinetics of dimeric dipeptide mimetic of nerve growth factor GC-2 in rats. Part 1. Single and multiple intravascular and extravascular administration. Testing the hypothesis of linearity of pharmacokinetics

Kravtsova OYu, Gribakina OG, Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Povarnina PYu, Zherdev VP 12

Comparison of pharmacokinetic parameters calculation techniques in studies with animal-point design

Kosman VM, Karlina MV, Makarova MN, Makarov VG 19

Quantitative determination of cyclic guanosine monophosphate (c-GMP) in rat tissues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry

Popov NS, Balabanyan VYu, Kolgina NYu, Petrov GA, Donskov SA, Atadzhanov IB 28

PRECLINICAL PHARMACODYNAMIC STUDIES

Pharmacological activity of calcium lactate on a model of dysbiosis in rats

Polyuga NL, Trofimets EI, Borovkova KE, Nikiforova LR, Salmova JV, Peleshok AA, Kryshen KL, Makarova MN, Kolodkin AM, Mitereva DE, Kasatkina IS 39

Neuropeptide cyclo-L-prolylglycine counteracts scopolamine-induced long-term memory impairment in rats in the novel object recognition test

Vorontsova ON, Alyaeva AG, Koliashnikova KN, Valdman EA, Povarnina PYu 50

Features of the compound ALM-802 antiarrhythmic action

Barchukov VV, Zinchenko VP, Tsorin IB, Teplov IYu, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA 56

Experimental investigation of the behavioral effects of new phosphorylated thiosemicarbazides

Nikitina AV, Semina II, Nikitin DO, Gavrilova EL, Burangulova RN, Krutov IA, Isaeva AO 68

Antidepressant activity of the pyrrolo[1,2a][1,4]diazepine GMAL-24 in a forced swimming test in mice

Korolev AO, Volkova AV, Kozin YS, Mokrov GV, Voronina TA, Kalinina TS 77

Study of the relationship between the severity of alcoholic cardiomyopathy and the level of alcohol consumption in male and female rats in the model of "home drinking"

Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Ionova EO, Barchukov VV, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kolik LG, Durnev AD 82

BIOEQUIVALENCE STUDIES

Study of the pharmacokinetic profile of the medicinal product Gidazepam®, tablets, 50 mg in a bioequivalence study

Baskakov EV, Grigorev AV, Globenko AA, Shmelev AG, Kolmykova EA, Yastrebova AV, Sidorova AA, Kapashin AV, Kovchan OV, Bashkatova AI, Pasko MA 94

Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 6. Бета-блокаторы

© Мокров Г. В.

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

Аннотация. β -Адреноблокаторы — один из старейших классов кардиопротекторов, применяемых при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Они уменьшают частоту сердечных сокращений, имеют гипотензивное действие, угнетают сократимость миокарда и обладают антиаритмическими свойствами. В ряду биароматических соединений с линейным линкером имеется достаточно обширная группа β -блокаторов, которые помимо двух ароматических ядер содержат в линкере 1,2-дигидрокси-3-аминопропановый фрагмент — ключевой для наличия β -блокирующей активности. Среди соединений этой группы имеются широко применяемые препараты небиволол и карведилол, которые используются при терапии хронической сердечной недостаточности и артериальной гипертензии.

Ключевые слова: антиаритмики; кардиопротекторы; блокаторы β -адренорецепторов; биароматические соединения

Для цитирования:

Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 6. Бета-блокаторы. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):3–11. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-3-11>

Поступила: 07.08.2023. **В доработанном виде:** 15.08.2023. **Принята к печати:** 25.08.2023. **Опубликована:** 30.09.2023.

Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 6. Beta blockers

© Grigory V. Mokrov

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

Abstract. β -Blockers are one of the oldest classes of cardioprotectors used in the treatment of cardiovascular diseases. They reduce the heart rate, have a hypotensive effect, inhibit myocardial contractility and have antiarrhythmic properties. In the series of biaromatic compounds with a linear linker, there is a quite large group of β -blockers, which in addition to two aromatic nuclei contain a 1,2-dihydroxy-3-aminopropane fragment in the linker, that is the key for the presence of β -blocking activity. Among the compounds of this group are widely used drugs nebivolol and carvedilol, which are used in the treatment of chronic heart failure and arterial hypertension.

Keywords: antiarrhythmics; cardioprotectors; β -adrenoreceptors blockers; biaromatic compounds

For citations:

Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 6. Beta blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):3–11. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-3-11>

Received: 07.08.2023. **Revision received:** 15.08.2023. **Accepted:** 25.08.2023. **Published:** 30.09.2023.

Список сокращений / List of abbreviations

ED ₅₀	—	Полуэффективная концентрация
FDA	—	Food and Drug Administration (Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США)
HCN	—	Циклически-нуклеотид-управляемый канал, активируемый гиперполяризацией»
hERG	—	Канал, кодируемы геном «human ether-a-go-go-related gene»
IC ₅₀	—	Полумаксимальная ингибирующая концентрация
K _B , K _D	—	Константа диссоциации
K _i	—	Константа ингибирования
Kv1.5	—	Потенциал-зависимый калиевый канал, изоформа 1.5
цАМФ	—	Циклический аденозинмонофосфат

Введение / Introduction

β -Адренорецепторы (β -АР) представляют собой класс рецепторов, связанных с G-белком, которые опосредуют сердечно-сосудистую функцию, вызванную активацией симпатической нервной системы при связывании лигандов этих рецепторов — катехоламинов. β -АР широко экспрессируются в кардиомиоцитах, гладкомышечных и эндотелиальных

клетках сердечно-сосудистой системы. В сердечной ткани преобладающими АР являются β 1-АР, которые играют важнейшую роль в регуляции функции сердца. Активация β -АР природными катехоламинами и/или вводимыми агонистами β -АР приводит к стимуляции сердечной деятельности, включая увеличение частоты сердечных сокращений (ЧСС) (положительный хронотропизм), силы сокращения (положительный инотропизм), ускорение расслабления (положительный

лузитропизм) и автоматизма. В частности, в сердце адреналин связывается с $\beta 1$ -АР, что стимулирует образование цАМФ через G-белок и повышает активность аденилатциклазы. В синусовом узле цАМФ активирует регулируемый циклическими нуклеотидами натриевый канал, в результате чего потенциал действия (ПД) развивается с большей скоростью, чем обычно, за счёт открытия потенциал-зависимых кальциевых каналов Т- и L-типа и увеличения ЧСС. После открытия каналов во время ПД в саркоплазматическом ретикулуме быстро высвобождается большое количество кальция, что приводит к повышенному инотропизму. При воздействии высоких уровней катехоламинов в сердце наблюдается подавление $\beta 1$ -АР и $\beta 2$ -АР. Это вызвано фосфорилированием β -АР либо протеинкиназой А, либо киназой β -АР [1].

Хотя опосредованная катехоламинами передача сигналов β -АР важна для нормальной сердечной функции, а сниженная экспрессия β -АР наблюдается при сердечной недостаточности, лечение антагонистами β -АР (β -блокаторами) по-прежнему считается золотым стандартом лечения хронической сердечной недостаточности (ХСН). Одна из гипотез состоит в том, что снижение количества β -АР при ХСН фактически предотвращает гиперстимуляцию сердца избытком катехоламинов. Кроме того, β -адреноблокаторы обладают антиаритмическим действием и предотвращают гипертрофию, апоптоз и некроз миокарда, вызванные гиперстимуляцией $\beta 1$ -АР. Другим важным механизмом действия β -блокаторов может быть повторная сенсibilизация передачи сигналов β -АР в кардиомиоцитах. Было обнаружено, что β -блокаторы вызывают ресенсибилизацию за счёт увеличения экспрессии β -АР, особенно $\beta 1$ -АР, и снижения уровня ингибирующего G-белка в поражённом сердце человека [2].

β -Адреноблокаторы — один из старейших классов кардиопротекторов, применяемых при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Первым β -блокатором, появившимся на рынке, был пропранолол. Он был открыт и охарактеризован сэром Джеймсом Блэком и его коллегами из Фармацевтического отдела ICI в 1964 г. Следует сразу отметить, что как для пропранолола, так и для подавляющего большинства других β -блокаторов ключевым структурным элементом в их молекулах является 1,2-дигидрокси-3-аминопропановый фрагмент, замещённый по внешней ОН-группе и атому азота. В дальнейшем описании для наглядности этот фрагмент выделен в структурах фиолетовым цветом [3].

Важно отметить, что существенной характеристикой β -блокаторов кардиотропных препаратов является их селективность в отношении $\beta 1$ -адренорецепторов. Нежелательная блокада $\beta 2$ может вызвать опасный для жизни бронхоспазм и снизить эффективность экстренной неотложной терапии агонистами $\beta 2$. Таким образом, неселективные продлевающие жизнь β -адреноблокаторы противопоказаны пациентам как с заболеваниями сердца, так и с астмой. Поэтому в более

поздних работах по поиску β -адреноблокаторов значительное внимание уделяется их $\beta 1$ -селективности [4].

В настоящем обзоре приводится анализ данных литературы по известным на сегодняшний день β -блокаторам с кардиопротекторными свойствами в ряду соединений с биароматической структурой с линейным линкером (БСЛ). Он продолжает серию работ по анализу кардиопротекторных свойств в группе биароматических соединений. Ранее были рассмотрены блокаторы кальциевых каналов [5], HCN-каналов [6], натриевых каналов [7], блокаторы/модуляторы hERG-каналов [8], блокаторы калиевых Kv1.5-каналов [9].

Небиволол и его аналоги / Nebivolol and its analogues

Поиски β -блокаторов среди БСЛ начались всего через несколько лет после открытия пропранолола. Ещё в 1970 г. *Howe R et al.* из Imperial Chemical Industries Limited (Англия) опубликовали результаты исследования производных 1,4-бензодиоксана и 2-хромана **1**, разработанных как структурные аналоги пропранолола (рис. 1). Среди этих соединений был идентифицирован самый мощный на тот момент β -блокатор **Howe-16**, который оказался в десять раз более мощным, чем пропранолол. Замена трет-бутильного заместителя в Howe-16 различными фрагментами, содержащими фенильное кольцо, привела к биароматическим производным, таким как **Howe-24** и **Howe-26**, которые также обладали высоким потенциалом. Перечисленные соединения подавляли тахикардию на 64, 45 и 45% в концентрациях 0,5 (Howe-16), 20 (Howe-24), и 2,5 (Howe-26) мкг/кг/мин, соответственно [10].

Используя эти данные, исследователи из Janssen Pharmaceutica в 1987 г. исследовали и запатентовали группу симметричных 2,2'-азандиил-бис[1-(хроман-2-ил)этан-1-олов] **2**. Почти все соединения из этой груп-

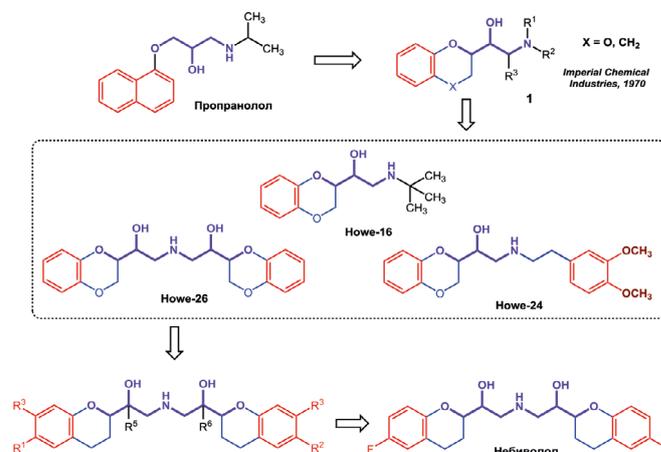


Рис. 1. Дизайн небиволола и его аналогов
Fig. 1. Development of neбиволол and its analogues

пы показали отличные характеристики связывания с β_1 -рецептором (значение ED_{50} в предсердии морской свинки < 2 мкг/л) и селективность в отношении рецептора β_2 (значение ED_{50} в трахее морской свинки > 1000 мкг/л) [11]. Небиволол, содержащий атомы фтора в качестве заместителя в ароматических группах, и обладающий высоким сродством к β_1 -АР ($A_2 = 5,8 \cdot 10^{-9}$ М; правое предсердие морской свинки) и селективностью по отношению к рецептору β_2 ($A_2 = 1,7 \cdot 10^{-6}$ М; трахея морской свинки) был выбран в качестве ведущего соединения для разработки. Интересно отметить, что как в структуре небиволола, так и во всём ряду его аналогов ключевой фрагмент β -адреноблокаторов дублируется в виде 3,3'-иминодипропан-1,2-диола.

Общая длина линкера, связывающего ароматические группы, составляет 10 связей [12]. Кардиопротекторные свойства небиволола как β -адреноблокатора были тщательно изучены и подтверждены в экспериментах на животных [13].

Эффективность небиволола была успешно подтверждена в клинических испытаниях в сравнении с другими препаратами, включая другие β -блокаторы, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента и антагонисты кальциевых каналов, у пациентов с артериальной гипертензией, стенокардией и хронической сердечной недостаточностью. Показано, что переносимость небиволола лучше, чем у атенолола и метопролола [14].

Толамолл и Бевантолол / Tolamolol and Bevantolol

В 1973 году исследователи из Pfizer опубликовали результаты исследований группы биароматических производных 3-((2-гидроксиэтил)амино)пропан-1,2-диола **3**, разработанных как потенциально β_1 -селективные аналоги практолола, в которых изопропиловый заместитель у атома азота был заменён на *O*-арилорксэтильный фрагмент (рис. 2). Наилучшие результаты в ингибировании β_1 -АР (в экспериментах *in vitro* по измерению антагонизма изопротеренол-стимулированной аденилатциклазы в образцах, полученных из гомогенатов сердца и лёгких крыс) показали соединения, содержащие метильную или метоксигруппу в ароматическом кольце, связанном с 1,2-дигидрокси-3-аминопропановым фармакофором и карбамоильную группу во втором ароматическом цикле.

Наиболее активным соединением оказался толамолл, обладающий селективностью в отношении рецеп-

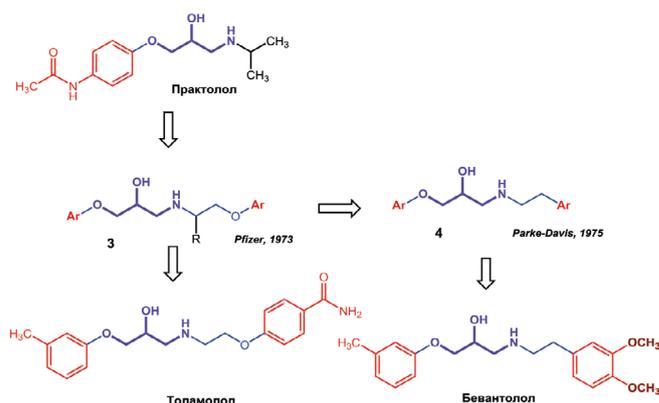


Рис. 2. Конструирование толамолла и бевантолола
Fig. 2. Development of tolamolol and bevantolol

торов миокарда (β_1) по сравнению с рецепторами периферических сосудов (β_2) у человека (IC_{50} (сердце) = 1,2 мкМ; IC_{50} (лёгкие) = 3,6 мкМ). Левозантиомер толамолла был значительно более активным, чем правозантиомер (IC_{50} (сердце) 0,37 мкМ против 7,6 мкМ) в соответствии с результатами для других оптически-активных блокаторов β_1 -АР, например, пропранолола и алпренолола.

В препаратах сердца и лёгких собак и папиллярных мышцах кошек толамолл оказывал заметно меньшее депрессивное действие на сердце, чем пропранолол. Эти признаки незначительной депрессии миокарда были подтверждены в исследованиях на людях. Толамолл проходил клинические исследования как потенциальное антиангинально-антиаритмическое средство, но его результаты не были опубликованы, а в дальнейшем это соединение не фигурировало в литературе [16].

Используя анализ связи «структура–активность» в ряде соединений, опубликованных Pfizer, Hoeftle ML et al. (Parke, Davis and Company, 1975) предложили группу производных 1-(ариламино)-3-арилоркси-2-пропанола **4** для повышения кардиоселективности соответствующих молекул. Вместо *O*-арилорксэтильной группы исследователи использовали более простую арил-этильную группу. Исследование показало, что 3,4-диметоксифенетильная аминогруппа ($NH-CH_2-CH_2-Ar$) оказалась уникальной в этой серии, так как придавала кардиоселективность β -блокирующей активности (модель морской свинки *in vitro*). Соединение бевантолол было определено (K_b (предсердие морской свинки) = $1,4 \cdot 10^{-8}$; K_b (трахея морской свинки) = $3,6 \cdot 10^{-7}$) как наиболее многообещающий лекарственный кандидат на основании эффективности, избирательности действия и минимума побочных эффектов [17]. Сердечно-сосудистые эффекты бевантолола подробно изучались на животных моделях [18].

Имеющиеся клинические данные указывают на то, что бевантолол является эффективным средством для лечения лёгкой и умеренной артериальной ги-

пертензии и стабильной стенокардии. Показано, что при артериальной гипертензии бевантолол обладает терапевтической эффективностью, сопоставимой с атенололом и пропранололом, в то время как у пациентов со стенокардией препарат превосходил по эффективности атенолол [19]. Антиангинальный эффект бевантолола был не меньшим по сравнению с атенололом [20]. Несмотря на убедительные данные о кардиопротекторной эффективности бевантолола, в 1989 г. компания Warner-Lambert, разработавшая препарат, решила не выпускать его на рынок по необычной причине: «Кому нужен 30-й β -адреноблокатор?» [21].

Буциндолол / Bucindolol

Kreighbaum WE et al. из Mead Johnson & Company (США) в 1980 г. опубликовали группу соединений **5**, сконструированных на основе имеющихся в то время данных, в качестве антагонистов β -адренорецепторов в сочетании с сосудорасширяющей активностью (рис. 3). Эта группа по структуре напоминает ранее упомянутую серию БСЛ с β -блокирующей активностью, однако в данном случае в качестве одного из арильных фармакофоров использовался индольный гетероцикл. Кроме того, этиленовый мостик, связывающий индольное кольцо с 1,2-дигидрокси-3-аминопропановым фармакофором, содержит две метильные группы. Наибольшую эффективность в сочетании β -блокирующей (торможение изопротеренол-индуцированной тахикардии у крыс) и антигипертензивной активности (систолическое артериальное давление (АД) крыс) среди исследованных соединений показали структуры, содержащие заместители в *О*-фенильном кольце во 2-м положении (метильную, трифторметильную или цианогруппу).

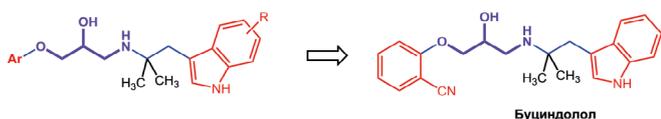


Рис. 3. Буциндолол и его группа
Fig. 3. Bucindolol and its group

Для дальнейшей разработки выбрано соединение **буциндолол** с 2-цианогруппой в фенильном кольце (71 % ингибирование тахикардии в дозе 2 мг/кг) [22]. Используя конкурентное связывание антагониста [¹²⁵I]йодоцианопиндолола, было показано, что буциндолол обладает таким же сродством к желудочковым β -рецепторам человека, как и пропранолол ($K_i = 3,7 \cdot 10^{-9}$ М) и эквивалентной способностью блокировать изопротеренол-индуцированную активность аденилатциклазы ($K_B = 2,8 \cdot 10^{-9}$ М) [23].

Кардиопротекторная активность буциндолола была продемонстрирована на ряде моделей крыс и

собак. Было показано, что этот препарат является эффективным средством для лечения больных стенокардией. У людей с ХСН буциндолол чрезвычайно хорошо переносится и вызывает улучшение систолической (фракция выброса, систолическая эластичность, сердечный индекс и ударная работа) и диастолической (изоволюмическая релаксация) функции левого желудочка при одновременном снижении давления в лёгочной артерии и ЧСС [24]. Разработчики более 10 лет пытались получить разрешение на применение буциндолола, но в 2009 году FDA всё же отклонило его [25].

Карведилол / Carvedilol

В 1985 г. компания Boehringer Mannheim GmbH (Германия) получила патент на группу карбазолсодержащих соединений **6**, соответствующих по строению известным в то время биароматическим β -блокаторам (рис. 4). Карбазольный гетероцикл в этих соединениях напрямую связан с фармакофором 1,2-дигидрокси-3-аминопропана. Второй ароматический заместитель, обычно монозамещённое фенильное кольцо, связан с центральным атомом азота этиленовым мостиком. Ингибирование изопреналиновой тахикардии принимали за меру β -блокирующей активности испытуемых соединений. Наилучшие результаты показал **карведилол** с *о*-метоксифенильной группой, обладающий сбалансированной вазодилатирующей (у наркотизированных кроликов) и β -блокирующей активностью [26].

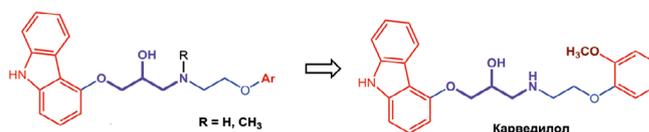


Рис. 4. Карведилол и его группа
Fig. 4. Carvedilol and its group

Исследования механизма действия карведилола показывают, что это соединение является мощным конкурентным антагонистом β_1 - и β_2 -АР с K_B 0,9 нМ для обоих подтипов β -АР (положительный хронотропный ответ изопротеренола в изолированном предсердии морской свинки и бронходилатация, вызванная изопротеренолом в трахее морской свинки, пораженной карбахолом) [27].

Карведилол оказывает кардиопротекторное действие на моделях острого инфаркта миокарда у животных и в этом отношении более эффективен, чем пропранолол при сопоставимых дозах. Это соединение также защищает от повреждения нейронов в моделях ишемии головного мозга *in vitro* и *in vivo* и оказывает антипролиферативное действие на гладкие мышцы сосудов *in vitro*.

Данные клинических исследований убедительно показали, что карведилол оказывает значительное антигипертензивное действие у пациентов с гипертонической болезнью лёгкой и средней степени тяжести. Также он снижает смертность и количество госпитализаций у пациентов с ХСН [28]. В мае 1997 года карведилол был одобрен для применения у пациентов с ХСН в США [29]. В настоящее время карведилол продолжает широко применяться для лечения ХСН и артериальной гипертензии.

CGP 20712 A

В первой половине 1980-х годов исследователи корпорации Siba-Geigy (США) создали группу потенциальных кардиопротекторов **7**, относящихся к группе БСЛ (рис. 5). При этом линкер имел достаточно универсальную для таких β-блокаторов структуру, а *O*-арильная группа была замещена дополнительным ароматическим или гетероароматическим фрагментом. Во второй ароматической группе в качестве заместителей использовали группу OH и свободную или замещённую карбамоильную группу [30].

Соединение **CGP20712A**, содержащее метил-трифторметил-имидазол в качестве гетероциклического заместителя и имеющее длину линкера 9 связей, было выбрано из этой серии в классическом скрининговом анализе. Это соединение было специфическим антагонистом β1-АР, лишённым внутренней симпатомиметической активности и мембраностабилизирующих свойств. CGP20712A обладало в 10 000 раз более высокой селективностью в отношении противодействия индуцированной изопротеренолом активации β1-АР (предсердия морской свинки) по сравнению с противодействием активации β2-АР (трахея морской свинки) [31].

В радиолигандном анализе с использованием клеток человека CGP20712A имел $pK_D = 8,76$ (β1-АР человека) и $pK_D = 5,62$ (β2-АР человека) с селективностью β1/β2 = 1380. Несмотря на такую высокую β1-селективность CGP20712A никогда не применялось в клинической практике [4].

β1-селективные ингибиторы / β1-selective inhibitors

В 1980-х годах *Louis WJ* (Остинская больница, Австралия) запатентовал группу кардиоселективных β-блокаторов **8** и **9** ряда БСЛ (рис. 6). Помимо клю-

чевого 1,2-дигидрокси-3-аминопропанового фармакофора в линкере, одно из ароматических ядер, связанное с атомом кислорода этого фрагмента, содержит линейный заместитель длиной до 7 связей с одним или двумя гетероатомами (кислород или сера). В большинстве случаев этим заместителем была (алкокси)этоксигруппа, очень похожая на группу в молекуле кардиоселективного β-адреноблокатора бисопролола. В первой группе соединений (**8**) дополнительным линкерным элементом, связывающим ароматические группы, была амидная группа или фрагмент мочевины. Во второй группе (**9**) связь 1,2-дигидрокси-3-аминопропанового фармакофора с арильной группой осуществлялась через алкильный мостик и в некоторых случаях через гетероатом (кислород или серу).

По результатам опытов в двух тестах (сердце/лёгкие морской свинки) установлено высокое сродство соединений к β1-адренорецепторам (10^{-9} – 10^{-6} М) и селективность к β2-адренорецепторам (коэффициент кардиоселективности до 5100) [32]. Одним из наиболее интересных соединений оказалось **LK 204–545** из первой группы. *O*-фенильное кольцо этого соединения содержит 2-цианогруппу и 2-(циклопропилметокси)этоксигруппу. Второе ароматическое кольцо, связанное мочевиным фрагментом, содержит группу 4–ОН. Соединение LK 204-545 имеет одни из лучших характеристик связывания с рецептором β1 и селективности β1/β2 за всю историю их поиска. Сродство связывания с рецепторами тканей человека составляло: β1- $pK_i = 8,52$; β2- $pK_i = 5,27$ (β1/β2-селективность = 1778); в тканях крыс: β1(атрия)- $pA_2 = 8,53$; β2(трахея)- $pA_2 = 4,73$ (β1/β2-селективность = 6310) [33]. Несмотря на столь замечательные характеристики, соединение LK 204-545 не получило дальнейшего практического развития.

В 1997 г. *Louis WJ et al.* из Мельбурнского университета (Австралия) в развитие своих предыдущих исследований запатентовали группу БСЛ **10** с той же структурой фармакофора, где *O*-фенильная группа содержала именно 2-(алкокси)этоксигруппу, а во втором ароматическом кольце, связанном с 1,2-дигидрокси-3-аминопропановым фрагментом через этиленовый мостик, всегда присутствовала пара-метоксигруппа. По результатам оценки β-адреноблокирующих свойств соединений установлено, что независимо от природы алкильной группы при этоксизаместителе и наличия второй метоксигруппы при втором фенильном кольце

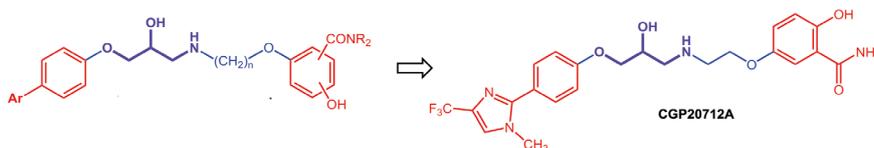


Рис. 5. CGP20712A и его группа
Fig. 5. CGP20712A and its group

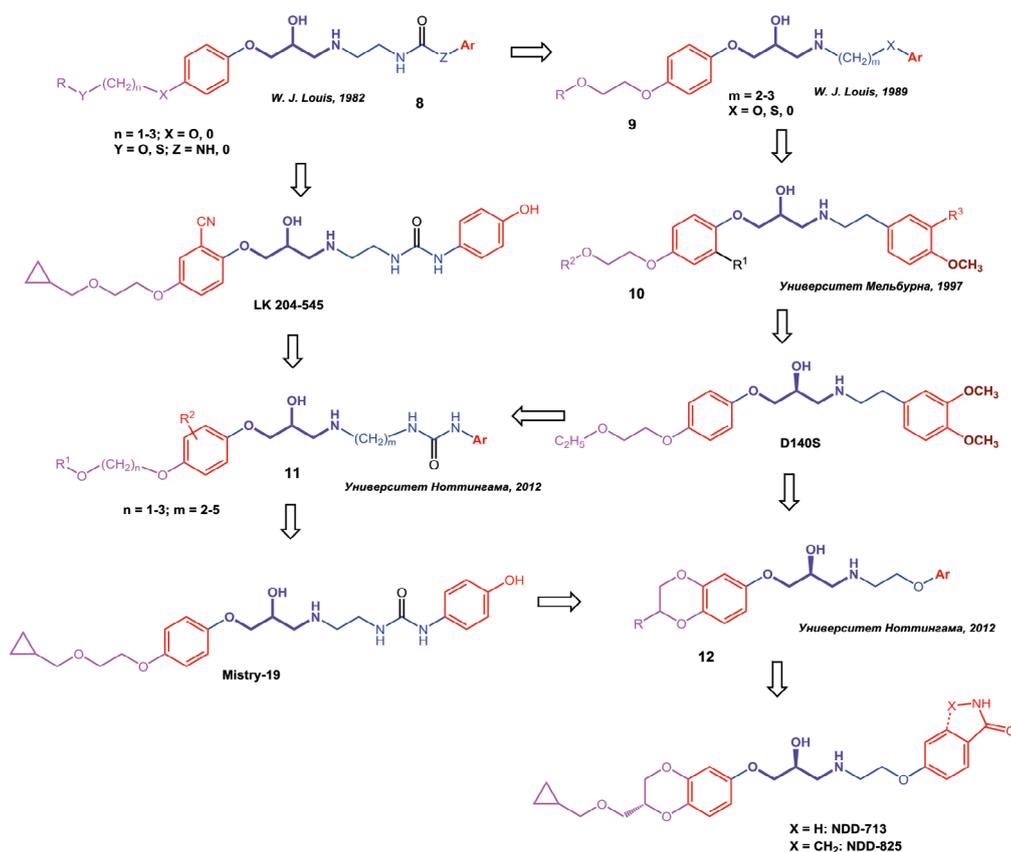


Рис. 6. Дизайн β_1 -селективных ингибиторов в ряду ЛБС с фрагментом OCH_2CH_2O
Fig. 6. Development of β_1 -selective inhibitors among LBC with OCH_2CH_2O fragment

вещества обладали убедительными β_1 -блокирующими свойствами (предсердие морской свинки) и селективностью по отношению к β_2 -рецепторам (трахея морской свинки). Наличие цианогруппы или атома галогена по сравнению с незамещённым *O*-фенильным кольцом также оказывало незначительное влияние [34].

В качестве лидерного соединения был выбран **D140S** с этоксигруппой и 3,4-диметоксифенильной группой при фармакофоре β -блокаторов. Это был высокоспецифичный β_1 -АР антагонист ($pA_2(\beta_1) = 8,15$, $pA_2(\beta_2) < 4,5$; β_1/β_2 селективность >4400 ; *in vitro* эксперименты с предсердиями и трахеями крыс). Влияние на вызванное изопреналином увеличение ЧСС и фармакодинамический период полураспада для **D140S** были сопоставимы с показателями эсмола у крыс [35].

Дальнейшее развитие этого направления осуществляли исследователи Ноттингемского университета (Великобритания). В 2012 г. *Mistry S et al.* запатентовали группу соединений **11**, построенных на основе структур **LK 204-545** и **D140S** [36]. Авторы варьировали заместители в фенильных кольцах и длину алифатических цепей (n и m). Показано, что наличие метильной, метокси- и гидроксигруппы или

атома галогена не оказывает большого влияния на β -блокирующие свойства и β_1/β_2 -селективность. Значения n и m , равные 2, являются оптимальными. Наилучшие характеристики показало соединение **Mistry-19**, которое оказалось дезциановым аналогом **LK 204-545**.

Было обнаружено, что значения $\text{Log } K_D$, полученные из анализов накопления 3H -цАМФ после ингибирования ответа агониста циматерола в клетках СНО, стабильно экспрессирующих человеческие β_1 -, β_2 - или β_3 -АР для **Mistry-19**, составляют $-7,75$, $-5,15$ и >10 мкМ, соответственно (селективность β_1 против $\beta_2 = 398$). **Mistry-19** существенно ингибировал β_1 -опосредованные ответы ЧСС на изопреналин в модели свободно движущихся крыс в сознании, не оказывая влияния на β_2 -опосредованный ответ задних конечностей, что согласуется с β_1 -селективностью этого соединения [37].

Те же исследователи в том же 2012 году запатентовали другую аналогичную группу соединений **12**, разработанную с использованием структур **D140S** и других его аналогов. В этом случае *O*-арильная группа присоединялась к диоксановому кольцу, заменяя фрагмент этоксигруппы **D140S**. Второй аро-

матический фармакофор был связан со стандартным 1,2-дигидрокси-3-аминопропановым фрагментом через оксиэтиловый мостик. Селективность лигандов для трёх β -АР оценивали в исследованиях их связывания с использованием ^3H -CGP1 2177 в клетках китайского хомячка, экспрессирующих человеческие β_1 -, β_2 - или β_3 -АР [38].

Наиболее активными оказались соединения **NDD-713** и **NDD-825**, которые содержат циклопропилметил-оксиметильный заместитель, аналогичный соединению Mistry-19, в диоксановом кольце и амидную группу во втором ароматическом кольце (свободную для NDD-713 или циклическую для NDD-825). Эти соединения имели следующие характеристики: для NDD-713— $\text{Log } K_D$ (β_1 -АР человека) = $-7,82$, $\text{Log } K_D$ (β_2 -АР человека) = $-5,05$; для NDD-825— $\text{Log } K_D$ (β_1 -АР человека) = $-8,28$, $\text{Log } K_D$ (β_2 -АР человека) = $-5,27$. Аналогичные результаты были получены в тканях крысы: для NDD-713— $\text{Log } K_D$ (β_1 -АР крысы) = $-8,07$, $\text{Log } K_D$ (β_2 -АР крысы) = $-4,73$; для NDD-825— $\text{Log } K_D$ (β_1 -АР крысы) = $-8,37$, $\text{Log } K_D$ (β_2 -АР крысы) = $-4,88$.

Для оценки β_1 -селективности *in vivo* соединения вводили крысам, находящимся в сознании, и контролировали ЧСС (β_1) и сосудистую проводимость задних конечностей (β_2). NDD-713 и NDD-825 подавляли базальную и изопреналин-индуцированную ЧСС, но не влияли на сосудистую проводимость задних конечностей, что подтверждало их высокую β_1 -селективность. Эти эффекты всё ещё были видны через 4,0–5,5 ч (3 ч после окончания внутривенной инфузии), а подавление базальной активности также наблюдалось через 24–25 ч (23–24 ч после окончания внутривенной инфузии), что соответствовало более длительному фармакокинетическому клиренсу. Эти соединения не обладали сродством к каналу hERG (в концентрациях >3000 -кратное сродство к β_1 -АР) и блокировали калиевый ток hERG только при высоких концентрациях ($\text{IC}_{50} > 10 \text{ мкМ}$). Эти лиганды предложены авторами в качестве перспективных

кандидатов для разработки β -блокаторов, лишённых β_2 -АР-опосредованных побочных эффектов бронхоспазма и вазоконстрикции, и могут оказаться полезными у пациентов с сопутствующими сердечно-сосудистыми и респираторными заболеваниями или ишемией конечностей (заболеваниями периферических сосудов) [4].

Последним примером создания соединений с β -блокирующими свойствами в серии БСЛ является работа *Ghabbour HA et al.* из Университета Мансура (Египет, 2014 г.). На основе структур β -блокаторов IPS 339 и фалинтолола, содержащих оксимные группы, авторы сконструировали ряд соединений **13**, среди которых 3,4-диметоксифенетильные производные с оксимсодержащим линкером длиной 10 связей имели наибольший потенциал по данным молекулярного докинга (рис. 7). Биологический скрининг *in vitro* на активность β_1 -АР с использованием изолированных предсердий морских свинок показал, что лучшими характеристиками обладает соединение **Ghabbour-4r** с хлортиофеновым заместителем. Он угнетал ЧСС на 31 % и угнетал сократительную способность предсердий на 55 %. Скрининг активности β_2 -АР с использованием изолированной трахеи морских свинок показал отсутствие β_2 -блокирующего действия Ghabbour-4r [39].

Выводы / Conclusions

Среди соединений, обладающих β -блокирующей активностью, идентифицировано значительное количество структур, относящихся к классу БСЛ. Некоторые из этих соединений являются клинически эффективными кардиопротекторными средствами, которые успешно применяются по сей день (небиволол, карведилол).

Анализ структур неселективных β -блокаторов или β_1 -блокаторов с низкой селективностью из класса БСЛ выявляет следующую модель этих структур (рис. 8). Ключевым компонентом линкера является

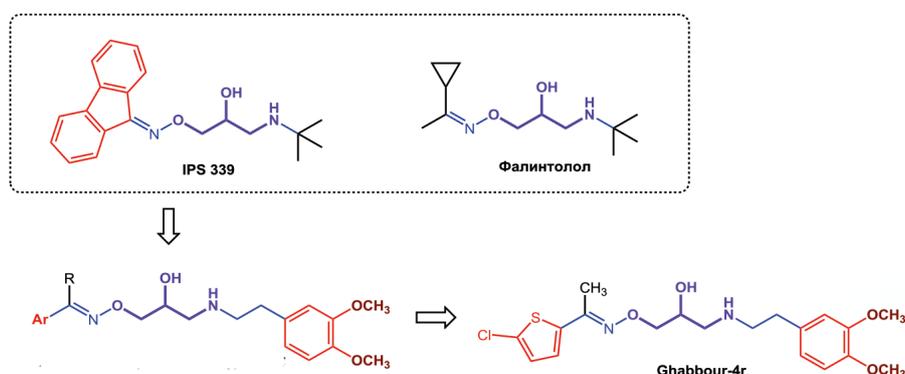


Рис. 7. Конструирование Ghabbour-4r и его группы
Fig. 7. Design of Ghabbour-4r and its group

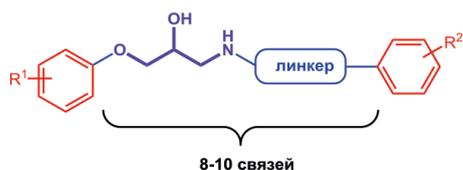


Рис. 8. Обобщённая модель неселективных β-блокаторов

Fig. 8. Nonselective β-blockers model

1,2-дигидрокси-3-аминопропановый фрагмент. Через атом кислорода он связывается с первой ароматической группой. Вторая ароматическая группа связана с атомом азота фармакофора 1,2-дигидрокси-3-аминопропана мостиком из 3-5 связей, который представляет собой алкильную цепь, часто содержащую один гетероатом. Небольшие заместители, такие как метокси, циано, метильная группа или атом галогена, часто присутствуют в ароматических фармакофорах соединений.

В группе β₁-селективных β-блокаторов их фармакофорная модель приобретает дополнительные элементы в дополнение к описанной выше модели (рис. 9). В них имеется фрагмент, содержащий два донора пары электронов, связанных через 3 связи (чаще всего это фрагмент O-CH₂-CH₂-O-) в O-арильной группе. Донор электронной пары (LPD) (гидрокси, метокси, карбонильные группы) также присутствует в качестве заместителя во втором ароматическом кольце.

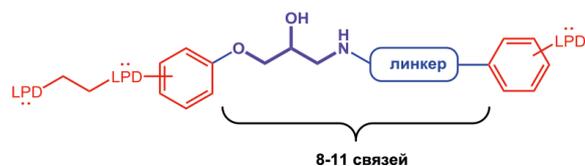


Рис. 9. Модель β₁-селективных блокаторов

Fig. 9. Selective β₁-blockers model

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 «НИИ 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. Fisker FY, Grimm D, Wehland M. Third-generation beta-adrenoceptor antagonists in the treatment of hypertension and heart failure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015 Jul;117(1):5–14. DOI: 10.1111/bcpt.12396.
2. Velmurugan BK, Baskaran R, Huang CY. Detailed insight on β-adrenoceptors as therapeutic targets. *Biomed Pharmacother.* 2019 Sep;117:109039. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109039.
3. Black JW, Crowther AF, ShankS RG, et al. A NEW ADRENERGIC BETARECEPTOR ANTAGONIST. *Lancet.* 1964 May 16;1(7342):1080–1081. DOI: 10.1016/s0140-6736(64)91275-9.
4. Baker JG, Gardiner SM, Woolard J, et al. Novel selective β₁-adrenoceptor antagonists for concomitant cardiovascular and respiratory disease. *FASEB J.* 2017;31(7):3150–3166. DOI: 10.1096/FJ.201601305R
5. 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. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* 2021;(4):3–17. (In Russ.)]. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-4-3-17.
6. Мокров Г.В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 2. Блокаторы HCN-каналов. *Фармакокинетика и Фармакодинамика.* 2022;(2):3–10. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 2. HCN channel blockers. *Pharmacokinetics*

and Pharmacodynamics. 2022;(2):3–10. (In Russ.)]. DOI: 10.37489/2587-7836-2022-2-03-10.

7. 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. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* 2022;(3):3–9. (In Russ.)]. DOI:10.37489/2587-7836-2022-3-3-9

8. 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. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* 2022;(4):3–19. (In Russ.)]. DOI:10.37489/2587-7836-2022-4-3-19.

9. Мокров Г.В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 5. Блокаторы калиевых каналов Kv1.5. *Фармакокинетика и Фармакодинамика.* 2023;(2):3–13. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 5. Potassium Kv1.5-channels blockers. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* 2023;(2):3–13. (In Russ.)]. DOI:10.37489/2587-7836-2023-2-3-13.

10. Howe R, Rao BS, Chodnekhar MS. Beta-adrenergic blocking agents. VII. 2-(1,4-benzodioxanyl) and 2-chromanyl analogs of pronethalol (2-isopropylamino-1-(2-naphthyl)ethanol). *J Med Chem.* 1970 Mar;13(2):169–176. DOI: 10.1021/jm00296a001.

11. Van Lommen GRE, De Bruyn MFL, Schroven MFJ. US Patent 4654362 A. Published online October 12, 1984.
12. Van de Water A, Janssens W, Van Neuten J, et al. Pharmacological and hemodynamic profile of nebivolol, a chemically novel, potent, and selective beta 1-adrenergic antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988 May;11(5):552–563. DOI: 10.1097/00005344-198805000-00007.
13. Mangrella M, Rossi F, Fici F, Rossi F. Pharmacology of nebivolol. *Pharmacol Res.* 1998 Dec;38(6):419–431. DOI: 10.1006/phrs.1998.0387. PMID: 9990650.
14. Weiss R. Nebivolol: A Novel Beta-Blocker with Nitric Oxide-Induced Vasodilatation. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2(3):303. DOI: 10.2147/VHRM.2006.2.3.303.
15. Olawi N, Krüger M, Grimm D, et al. Nebivolol in the treatment of arterial hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2019 Sep;125(3):189–201. DOI: 10.1111/bcpt.13248.
16. Augstein J, Cox DA, Ham AL, et al. Beta-adrenoceptor blocking agents. 1. Cardioselective 1-aryloxy-3-(aryloxyalkylamino)propan-2-ols. *J Med Chem.* 1973 Nov;16(11):1245–1251. DOI: 10.1021/jm00269a007.
17. Hoefle ML, Hastings SG, Meyer RF, et al. Cardioselective beta-adrenergic blocking agents. 1. 1-(3,4-Dimethoxyphenethyl)amino)-3-aryloxy-2-propanols. *J Med Chem.* 1975 Feb;18(2):148–152. DOI: 10.1021/jm00236a007.
18. Dukes ID, Vaughan Williams EM. Cardiovascular effects of bevantolol, a selective beta 1-adrenoceptor antagonist with a novel pharmacological profile. *Br J Pharmacol.* 1985 Feb;84(2):365–380. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1985.tb12921.x.
19. Frishman WH, Goldberg RJ, Benfield P. Bevantolol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in hypertension and angina pectoris. *Drugs.* 1988 Jan;35(1):1–21. DOI: 10.2165/00003495-198835010-00001.
20. Rodrigues EA, Lawrence JD, Dasgupta P, et al. Comparison of bevantolol and atenolol in chronic stable angina. *Am J Cardiol.* 1988 Jun 1;61(15):1204–1209. DOI: 10.1016/0002-9149(88)91155-1.
21. Warner-lambert pipeline narrowed to 40 active research compounds: accupril (quinapril) nda submitted jan. 25; \$80 Mil. budgetted for c-v work in 1989 : Pink Sheet. Published 1989. Accessed October 28, 2021. <https://pink.pharmaintelligence.informa.com/ps015015/warnerlambert-pipeline-narrowed-to-40-active-research-compounds-accupril-quinapril-nda-submitted-jan-25-80-mil-budgetted-for-cv-work-in-1989>
22. Kreighbaum WE, Matier WL, Dennis RD, et al. Antihypertensive indole derivatives of phenoxypropanolamines with beta-adrenergic receptor antagonist and vasodilating activity. *J Med Chem.* 1980 Mar;23(3):285–289. DOI: 10.1021/jm00177a015.
23. Hershberger RE, Wynn JR, Sundberg L, Bristow MR. Mechanism of action of bucindolol in human ventricular myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;15(6):959–967. DOI: 10.1097/00005344-199006000-00014.
24. Eichhorn EJ. Effects of bucindolol in heart failure. *Am J Cardiol.* 1993 Mar 25;71(9):65C–70C. DOI: 10.1016/0002-9149(93)90089-u.
25. FDA rejects bucindolol and questions trial integrity. Published 2009. Accessed October 28, 2021. <http://www.cardiobrief.org/2009/06/02/fda-rejects-bucindolol-and-questions-trial-integrity/>
26. Wiedemann F, Kampe W, Thiel M, Sponer G, Roesch E, Dietmann K. US Patent 4503067. Published online 1985. <https://www.uspto.gov/web/offices/com/sol/foia/comm/pte/4503067.pdf>
27. Ruffolo RR, Gellai M, Hieble JP, et al. The pharmacology of carvedilol. *Eur J Clin Pharmacol.* 1990;38 Suppl 2:S82–8. doi: 10.1007/BF01409471.
28. Mctavish D, Campoli-Richards D, Sorkin EM, Doggrel SA. Carvedilol A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy. *Drugs.* 1993;45(2):232–258. DOI: 10.2165/00003495-199345020-00006.
29. Book WM. Carvedilol: A Nonselective β Blocking Agent With Antioxidant Properties. *Congest Hear Fail.* 2002;8(3):173–177, 190. DOI: 10.1111/j.1527-5299.2002.00718.x.
30. Fuhrer W, Ostermayer F, Zimmermann M. US Patent 4559354. Published online 1985.
31. Dooley DJ, Bittiger H, Reymann NC. CGP 20712 A: a useful tool for quantitating β 1- and β 2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 1986;130(1-2):137–139. DOI: 10.1016/0014-2999(86)90193-7.
32. Louis WJ, Berthold R, Stoll A. US Patent 4816604. Published online 1989.
33. Louis SNS, Nero TL, Iakovidis D, et al. LK 204–545, a highly selective β 1-adrenoceptor antagonist at human β -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 1999;367(2-3):431–5. doi: 10.1016/S0014-2999(99)00019-9.
34. Louis WJ, Jackman GP, Iakovidis D, Louis SN, Drummer OH. WO Patent 97/13744A1. Published online 1997. Accessed October 28, 2021. <https://patentimages.storage.googleapis.com/cf/b4/ed/cdbb8d5fd23dd/WO1997013744A1.pdf>
35. Jackman GP, Iakovidis D, Nero TL, et al. Synthesis, β -adrenoceptor pharmacology and toxicology of S-(–)-1-(4-(2-ethoxyethoxy)phenoxy)-2-hydroxy-3-(2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylamino)propane hydrochloride, a short acting β 1-specific antagonist. *Eur J Med Chem.* 2002;37(9):731–41. DOI: 10.1016/S0223-5234(02)01399-5.
36. Mistry S, Daras E, Fromont C, et al. WO Patent 2021/004549 A1. Published online 2012.
37. Mistry SN, Baker JG, Fischer PM, et al. Synthesis and *in Vitro* and *in Vivo* Characterization of Highly β 1-Selective β -Adrenoceptor Partial Agonists. *J Med Chem.* 2013;56(10):3852–3865. DOI: 10.1021/jm400348g.
38. Baker JG, Fischer PM, Fromont C, et al. WO Patent 2021/104659 A1. Published online 2012.
39. Ghabbour HA, El-Bendary ER, El-Ashmawy MB, El-Kerdawy MM. Synthesis, Docking Study and β -Adrenoceptor Activity of Some New Oxime Ether Derivatives. *Molecules.* 2014;19(3):3417–3435. DOI: 10.3390/molecules19033417.

Фармакокинетика димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 у крыс. Часть 1. Однократное и многократное внутрисосудистое и внесосудистое введение. Проверка гипотезы линейности фармакокинетики

© Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Бочков П. О., Поварнина П. Ю., Жердев В. П.

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

Аннотация. Изучена фармакокинетика димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 в плазме крови крыс при разных путях введения в дозе 150 мг/кг одно- и многократно. После однократного внутривенного и внутрибрюшинного введения ГК-2 регистрировался на протяжении 2 ч, его период полувыведения составил 0,4 ч. Абсолютная биодоступность ГК-2 после однократного внутрибрюшинного введения составила 84,62 %, что говорит о перспективе разработки его инъекционной (внутримышечно) лекарственной формы. После 4-кратного (интервал дозирования 1,5 ч) введения внутрибрюшинно дозозависимые фармакокинетические параметры ГК-2 практически не меняются по сравнению с однократным введением. Это указывает на то, что ГК-2 в организме крыс не кумулируется. Проведена проверка гипотезы линейности фармакокинетики ГК-2 в плазме крови крыс после однократного внутрибрюшинного введения в дозах: 50, 100 и 150 мг/кг. Установлено, что кинетика ГК-2 в плазме крови крыс линейна в изучаемом диапазоне доз.

Ключевые слова: фактор роста нервов; димерный дипептидный миметик ГК-2; фармакокинетика; абсолютная биодоступность; линейность кинетики

Для цитирования:

Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Бочков П. О., Поварнина П. Ю., Жердев В. П. Фармакокинетика димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 у крыс. Часть 1. Однократное и многократное внутрисосудистое и внесосудистое введение. Проверка гипотезы линейности фармакокинетики. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):12–18. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-12-18>

Поступила: 06.07.2023. **В доработанном виде:** 13.07.2023. **Принята к печати:** 17.07.2023. **Опубликована:** 30.09.2023.

Pharmacokinetics of dimeric dipeptide mimetic of nerve growth factor GC-2 in rats. Part 1. Single and multiple intravascular and extravascular administration. Testing the hypothesis of linearity of pharmacokinetics

© Oxana Yu. Kravtsova, Oxana G. Gribakina, Gennadiy B. Kolyvanov, Alexander A. Litvin, Pavel O. Bochkov, Polina Yu. Povarnina, Vladimir P. Zherdev
FSBI "Research Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. The pharmacokinetics of dimeric dipeptide mimetic of nerve growth factor GC-2 in the rat blood plasma after different routes of administration was studied. The drug was administered at dose of 150 mg/kg by single and repeatedly. After single intravenous and intraperitoneal injection, GC-2 was detected for 2 h, its half-life was 0.4 h. GC-2 absolute bioavailability after single intraperitoneal injection was 84.62 %, that indicates the prospect of development its injectable (intramuscularly) dosage form. After 4-fold (1.5 h dosing interval) intraperitoneal injection dose-independent pharmacokinetic parameters of GC-2 practically do not change compared to single administration. This indicates that GC-2 is not accumulated in the body of rats. The hypothesis of the linearity of the pharmacokinetics of GC-2 in the rats blood plasma after single intraperitoneal administration at doses of 50, 100 and 150 mg/kg was tested. It was found that the kinetics of GC-2 in the rat blood plasma is linear.

Keywords: nerve growth factor; dimeric dipeptide mimetic GK-2; preclinical pharmacokinetics; absolute bioavailability; linearity of kinetics

For citations:

Kravtsova OYu, Gribakina OG, Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Povarnina PYu, Zherdev VP. Pharmacokinetics of dimeric dipeptide mimetic of nerve growth factor GC-2 in rats. Part 1. Single and multiple intravascular and extravascular administration. Testing the hypothesis of linearity of pharmacokinetics. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):12–18. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-12-18>

Received: 06.07.2023. **Revision received:** 13.07.2023. **Accepted:** 17.07.2023. **Published:** 30.09.2023.

Введение / Introduction

В настоящее время отмечается рост больных с патологиями, сопровождающимися нейродегенеративными процессами. Основным методом лечения ишемических инсультов является реперфузионная терапия, которая однако не всегда может быть своевременно применена, имеет ряд противопоказаний и может приводить к геморрагическим осложнениям [1, 2]. В качестве другого важного вида фармакотерапии используются нейропротекторы, но существующие лекарственные средства (ЛС) недостаточно эффек-

тивны, и их действие в значительной степени зависит от времени начала применения.

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» на основе гипотезы о ключевой роли наиболее экспонированных дипептидных фрагментов β -изгибов петлеобразных структур нейротрофинов создан димерный дипептидный миметик четвертой петли NGF гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизин) с рабочим шифром ГК-2 [3]. В экспериментах *in vitro* на клетках линии НТ-22 Вестерн-блот анализом показано, что ГК-2 активирует специфические для NGF TrkA-рецепторы и его сигнальные пути PI3K/

АКТ и PLC- γ 1 [4, 5]. Выявлено, что дипептид ГК-2 проявляет нейротропную активность на ряде клеточных моделей в интервале концентраций 10^{-5} – 10^{-9} М [5, 6], при этом не проявляя нежелательных побочных эффектов, характерных для NGF, а именно, не вызывает гипералгезии и снижения массы тела [5].

Доклиническое изучение фармакокинетики (ФК) ЛС — необходимый этап в его продвижении в клиническую практику [7]. Важнейшим аспектом ФК анализа является проверка гипотезы линейности, поскольку она позволяет оценить предсказуемость изменений концентрации в ответ на изменение дозы ЛС — линейность предусматривает, что увеличение дозы препарата приводит к пропорциональному увеличению его концентрации в системном кровотоке в каждый период наблюдений [8]. В связи с вышесказанным целью данного исследования стало изучение ФК нового оригинального димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 в плазме крови крыс после его однократного внутри- и внесосудистого введений, многократного внесосудистого введения и проверка гипотезы линейности кинетики при однократном внесосудистом введении в трёх разных дозах.

Материалы и методы / Materials and methods

В работе использовали фармацевтическую субстанцию, синтезированную в лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»: гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина), ГК-2 (серия—СН-13-88), молекулярная масса — 830,9 а. е. м. [9]. Субстанция представляет собой гомогенный порошок почти белого цвета, без запаха. Она легко растворима в воде, практически не растворима в этаноле, хлороформе и гексане.

Исследование ФК ГК-2 проводили на половозрелых белых беспородных крысах-самцах с массой тела 180–220 г. Животные содержались в лабораторном виварии при 20–22 °С, относительной влажности воздуха 45–65 %, имели постоянный доступ к корму и воде. Эксперименты проводили в соответствии с решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

ФК ГК-2 изучали в плазме крови крыс после введения в дозе 150 мг/кг в виде водного раствора однократно (внутрибрюшинно (в/б) и внутривенно (в/в)) и многократно (4 раза с интервалом дозирования — 1,5 ч) в/б.

Оценку линейности ФК ГК-2 осуществляли после однократного в/б введения в виде водного раствора в дозах — 50, 100 и 150 мг/кг.

Содержание ГК-2 определяли в плазме крови через 0 (контроль), 5, 10, 20 и 30 мин и 1,0; 1,5; 2,0 ч после однократного введения. На каждый времен-

ной интервал использовали по 5 животных. После многократного введения количество ГК-2 оценивали в плазме крови через 0 (контроль), 30 мин, 1,0 и 1,5 ч после последнего введения (на временной интервал — 3 крысы). Образцы крови животных отбирали декапитацией в пробирки с антикоагулянтом (5 % K_2 ЭДТА) с последующим центрифугированием при 13500 об/мин в течение 15 мин для отделения плазмы. Пробы плазмы крови замораживали при –40 °С и хранили без добавления консервантов до анализа. Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены в соответствии с нормативной документацией (ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014), касающейся гуманного обращения с животными, и стандартными операционными процедурами лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Проведение экспериментов с животными одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Для количественного определения ГК-2 в плазме крови животных использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием (нижний предел количественного определения применяемой валидированной методики составил 5 нг/мл биоматериала) [10].

Основные ФК параметры ГК-2 рассчитаны модельно-независимым методом [11]:

- AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ — площадь под фармакокинетической кривой (площадь под кривой концентрация соединения — время) рассчитанная от момента введения и до последнего временного интервала отбора проб (t) или до бесконечности (∞), соответственно;
- C_0 — кажущаяся концентрация вещества в плазме крови после в/в введения в нулевой момент времени;
- C_{max} — максимальная концентрация вещества в плазме крови после в/б введения;
- T_{max} — время достижения C_{max} исследуемого соединения в плазме крови после в/б введения;
- MRT — среднее время удерживания исследуемого соединения ЛС в организме;
- k_{el} — константа скорости элиминации;
- $t_{1/2el}$ — период, за который выводится половина введённой и всосавшейся дозы анализируемого вещества;
- Cl — клиренс после в/в введения;
- Cl/F — клиренс после в/б введения;
- V_d — кажущийся объём распределения после в/в введения;
- Vd/F — кажущийся объём распределения после в/б введения.

Величину абсолютной биодоступности ($f_{абс.}$) определяли по следующей формуле [7]:

$$f_{абс.} = \frac{AUC_{0-\infty(в/б)}}{AUC_{0-\infty(в/в)}} \times 100,$$

где $AUC_{0-\infty(v/b)}$ — AUC в плазме крови после в/б введения;

$AUC_{0-\infty(v/v)}$ — AUC в плазме крови после в/в введения.

Поскольку на каждую временную точку использовали по 5 или 3 крысы, результирующие ФК кривые были построены по усредненным концентрациям и поэтому при расчётах ФК параметров отсутствует статистическая обработка результатов.

Результаты и их обсуждение / Results and discussion

Фармакокинетика ГК-2 в плазме крови крыс после его однократного внутри- и внесосудистого введения

Усредненные ФК кривые ГК-2 в плазме крови крыс после в/в и в/б введений в дозе 150 мг/кг представлены на рис. 1, соответствующие фармакокинетические параметры — в табл. 1. Установлено, что после и внутри-, и внесосудистого введения целевое соединение определяется в плазме крови животных на протяжении 2 ч. Максимальная концентрация (C_{max} — 8,27 мкг/мл) ГК-2 после в/б введения регистрировалась через 0,08 ч (T_{max}), а C_0 после в/в введения составила 16,19 мкг/мл. Снижение концентраций ГК-2 в плазме крови после обоих введений носит моноэкспоненциальный характер. Период полуэлиминации ГК-2 ($t_{1/2el}$) при в/в и в/б введениях составил 0,41 ч и 0,39 ч, соответственно, а величины MRT — 0,64 и 0,54 ч, соответственно. Величины этих параметров характеризуют исследуемое соединение, как «короткоживущее» в кровяном русле ЛС.

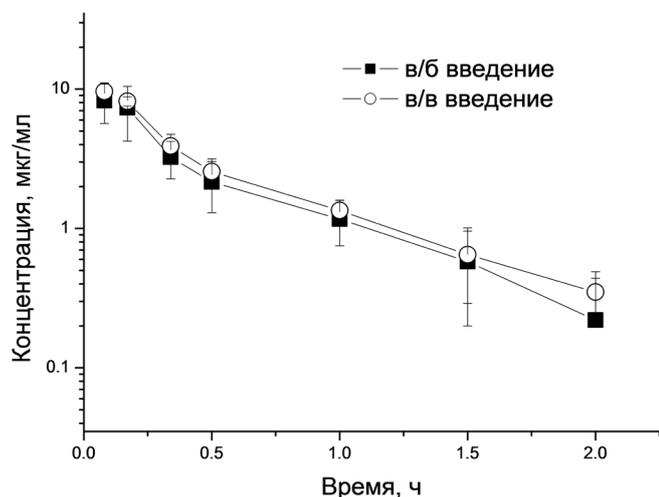


Рис. 1. Фармакокинетические профили ГК-2 в плазме крови крыс после однократного внутрибрюшинного и внутривенного введений в дозе 150 мг/кг, полулогарифмическая система координат ($n = 5$; среднее \pm стандартное отклонение)

Fig. 1. Pharmacokinetic profiles of GC-2 in rat blood plasma after a single intraperitoneal and intravenous administration at a dose of 150 mg/kg, semi-logarithmic coordinate system ($n = 5$; mean \pm SD)

Таблица 1

Фармакокинетические параметры ГК-2 в плазме крови крыс после однократного в/в и в/б введений в дозе 150 мг/кг

Table 1

Pharmacokinetic parameters of GC-2 in rat blood plasma after a single intravenous and intravenous administration at a dose of 150 mg/kg

Параметры	Способ введения	
	в/в	в/б
C_0, C_{max} (МКГ/МЛ)	16,19	8,27
T_{max} (ч)	—	0,08
AUC_{0-t} (МКГ/МЛ×Ч)	4,08	3,51
$AUC_{0-\infty}$ (МКГ/МЛ×Ч)	4,29	3,63
$t_{1/2el}$ (ч)	0,41	0,39
k_{el} (ч ⁻¹)	1,68	1,79
MRT (ч)	0,64	0,54
$V_d, V_d/F$ (Л/КГ)	21,75	24,05
Cl, Cl/F (Л/Ч/КГ)	36,76	42,74
$f_{abs.}$ (%)	—	84,62

Величина кажущегося объёма распределения (V_d/F) ГК-2 после в/б введения составила 24,05 л/кг. Кажущийся объём распределения обычно не эквивалентен анатомическому объёму, а отражает распределение препарата и степень его связывания в организме. Так, если препарат связывается преимущественно белками крови, V_d будет меньше, чем реальный. С другой стороны, преимущественное связывание препарата во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения V_d над реальным объёмом. Учитывая, что величина V_d/F ГК-2 превышает анатомический объём крови крысы можно утверждать, что исследуемое ЛС распределяется во внесосудистом пространстве (плазма крови, ткани) животных, но не накапливается в тканях. Величина кажущегося объёма распределения (V_d) для в/в введения была меньше значения полученного после в/б введения на 10 % и составила 21,75 л/кг, что говорит о том, что в/б введение обеспечивает более интенсивное распределение исследуемого вещества в органах и тканях крыс [11].

Абсолютная биодоступность соединения ГК-2 после в/б введения в сравнении с в/в введением составила 84,62 %, что говорит о потенциальной возможности разработки его лекарственной формы для внутримышечного применения.

Фармакокинетика ГК-2 в плазме крови крыс после многократного внесосудистого введения

Изучение ФК ГК-2 в плазме крови крыс проводилось также после его 4-кратного в/б введения в дозе 150 мг/кг. Интервал дозирования исследуемого вещества определяли, исходя из величины $t_{1/2el}$ ГК-2 после однократного в/в введения, т. е. 0,41 ч. Другими словами, через 2 ч после введения уровень препарата

в плазме крови составит немногим более 3,1 % от максимальной концентрации. Поэтому для обеспечения достаточно высоких концентраций ГК-2 в плазме крови и для удобства дозирования препарат вводили через каждые 1,5 ч.

Была построена усреднённая ФК кривая ГК-2 в плазме крови крыс после последнего из 4-х введений с интервалом дозирования 1,5 ч, рассчитаны соответствующие ФК параметры (табл. 2).

Таблица 2

Фармакокинетические параметры ГК-2 в плазме крови крыс после его 4-кратного (интервал дозирования 1,5 ч) в/б введения в дозе 150 мг/кг

Table 2

Pharmacokinetic parameters of GC-2 in rat blood plasma after its 4-fold (1.5 h dosing interval) intravenous administration at a dose of 150 mg/kg

Параметр	Значение
C_{max} (мкг/мл)	6,70
T_{max} (ч)	0,50
AUC_{0-t} (мкг/мл×ч)	18,25
$t_{1/2el}$ (ч)	0,34
k_{el} (ч ⁻¹)	2,05
Cl/F (л/ч/кг)	32,19
V_d/F (л/кг)	15,79

На основании значений ФК параметров, приведённых в табл. 2, была смоделирована (программа PK-Calc) усреднённая ФК кривая ГК-2 в плазме крови крыс при многократном введении (рис. 2).

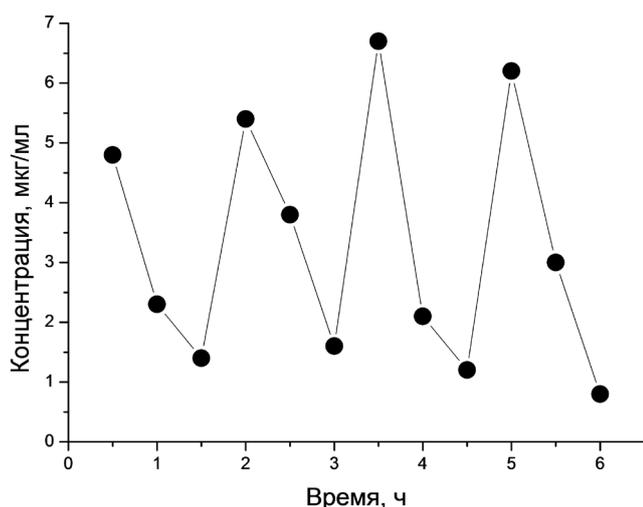


Рис. 2. Усреднённая фармакокинетическая кривая ГК-2 в плазме крови крыс после 4-кратного введения внутривенно в дозе 150 мг/кг (симуляция)

Fig. 2. Averaged pharmacokinetic curve of GC-2 in rat blood plasma after 4-fold intraperitoneal administration at a dose of 150 mg/kg (simulation)

Из табл. 2 следует, что по сравнению с однократным, после 4-кратного введения ГК-2 в дозе 150 мг/кг дозозависимые ФК параметры исследуемого соединения практически не изменились (см. табл. 1). Так, период полувыведения ГК-2 уменьшился с 0,41 до 0,34 ч, т. е. на 5 мин, а кажущийся объём распределения — с 21,75 до 15,79 л/кг. При этом общий плазменный клиренс изучаемого соединения уменьшился с 36,76 до 32,19 л/ч/кг. Полученные результаты указывают на то, что ГК-2, по-видимому, не кумулируется в организме крыс.

Проверка гипотезы линейности фармакокинетики ГК-2

Для оценки линейности ФК ГК-2 субстанцию препарата вводили крысам в/б однократно в дозах 50, 100 и 150 мг/кг.

ФК параметры ГК-2, рассчитанные по усреднённым ФК кривым в плазме крови крыс после однократного в/б введения в 3 разных дозах, представлены в табл. 3.

Таблица 3

Фармакокинетические параметры ГК-2 в плазме крови крыс после его однократного в/б введения в дозах 50, 100 и 150 мг/кг

Table 3

Pharmacokinetic parameters of GC-2 in rat blood plasma after its single intravenous administration at doses of 50, 100 and 150 mg / kg

Параметр	Доза (мг/кг)		
	50	100	150
C_{max} (мкг/мл)	3,09	6,21	8,27
T_{max} (ч)	0,08	0,08	0,08
AUC_{0-t} (мкг/мл×ч)	1,58	3,15	3,83
$AUC_{0-\infty}$ (мкг/мл×ч)	1,63	3,29	3,96
k_{el} (ч ⁻¹)	1,73	1,61	1,79
$t_{1/2el}$ (ч)	0,40	0,43	0,39
MRT (ч)	0,65	0,68	0,56

Статистический анализ ФК данных может обойти неопределённость, связанную с дозозависимостью, в ситуации, когда исследуемое вещество находится в системном кровотоке. Действительно, при повышении дозы препарата его кинетика может стать нелинейной (непропорциональное увеличение рассматриваемого параметра в зависимости от дозы). Общий метод оценки пропорциональности доз — нормирование значений AUC (или C_{max}) к дозе и оценка постоянства отношений между исследуемыми дозами [11, 12]. В некоторых случаях нелинейность может быть неочевидна вследствие вариабельности измеряемого показателя. Решить эту проблему может нелинейная степенная модель.

Пропорциональную (линейную) зависимость можно записать в виде степенной функции:

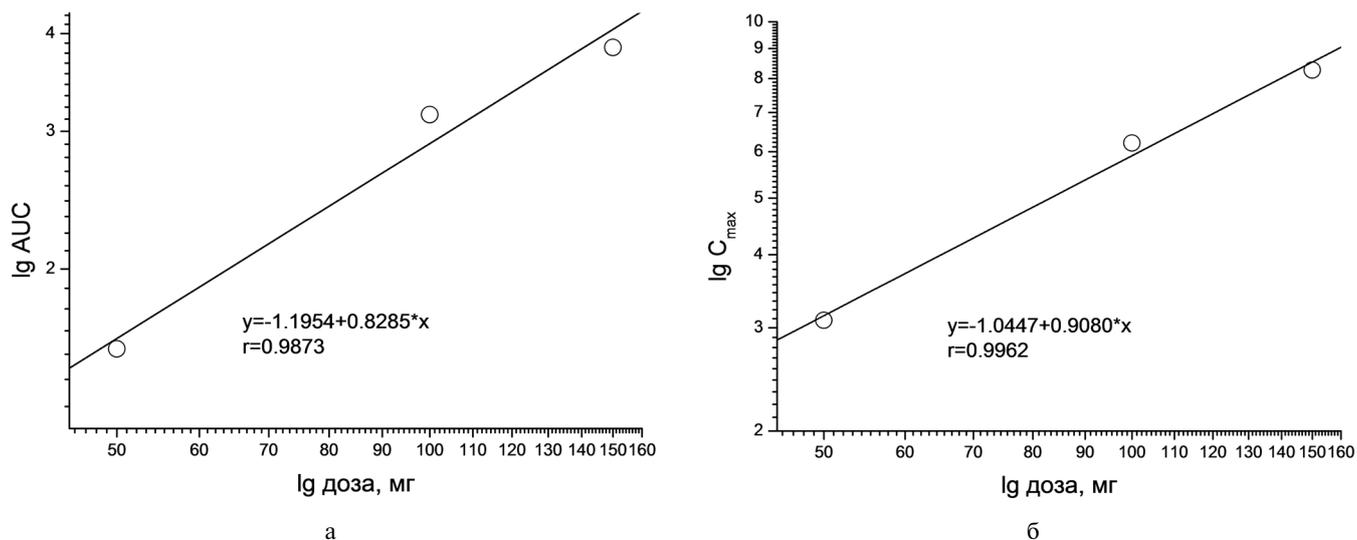


Рис. 3. Оценка линейности фармакокинетики ГК-2 в плазме крови крыс по изменению значения $AUC_{0 \rightarrow t}$, мкг/мл \times ч (а) и C_{max} , мкг/мл (б) в зависимости от дозы
Fig. 3. Evaluation of the linearity of the pharmacokinetics of GK-2 in rat blood plasma by changing the $AUC_{0 \rightarrow t}$, mkg/ml \times h (a) and C_{max} , mkg/ml (b) depending on the dose

$$AUC = a \times \text{доза}^b,$$

где b — константа пропорциональности; a — точка пересечения функции с осью абсцисс. Линеаризация этой зависимости даёт:

$$\lg AUC = \lg a + \lg \text{доза} \times b$$

При $b = 1$ зависимость является пропорциональной, другими словами, линейной. Следовательно, данный тип модели может количественно оценить отклонение от линейности кинетики.

На рис. 3 представлены графические зависимости десятичных логарифмов $AUC_{0 \rightarrow t}$ (а) и C_{max} (б) ГК-2 в плазме крови крыс от десятичного логарифма введённой дозы ЛС.

Из рис. 3 видно, что показатель b , характеризующий наклон кривых, достоверно приближается к 1. Для AUC показатель составил 0,83 и для C_{max} — 0,91. Таким образом, можно сделать вывод, что кинетика ГК-2 в плазме крови крыс в диапазоне доз 50–150 мг/кг линейна.

Заключение / Conclusion

В результате проведённого доклинического исследования ФК димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 выявлено:

- 1) после однократных в/в и в/б введений в дозе 150 мг/кг ГК-2 определяется в плазме крови крыс на протяжении 2 ч, его период полувыведения составляет около 0,41 ч после обоих путей введения, что характеризует ЛС как «короткоживущее» в кровяном русле;
- 2) абсолютная биодоступность ГК-2 после в/б введения в сравнении с в/в введением составляет 84,62 %, что говорит о потенциальной возможности разработки его лекарственной формы для внутримышечного применения;
- 3) после 4-кратного (интервал дозирования 1,5 ч) в/б введения в дозе 150 мг/кг ГК-2 в организме крыс не кумулируется;
- 4) ФК ГК-2 в плазме крови крыс после однократного в/б введения линейна в диапазоне доз 50–150 мг/кг.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Кравцова Оксана Юрьевна

e-mail: oukravtsova@yahoo.com

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

SPIN-код: 1733-2330

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

Oxana Yu. Kravtsova

e-mail: oukravtsova@yahoo.com

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

SPIN code: 1733-2330

PhD, Cand. Sci. (Biology), senior research scientist of the laboratory of pharmacokinetics FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Грибакина Оксана Геннадьевна

e-mail: pron-ox@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4604-4346>
 SPIN-код: 6266-8161
 к. б. н., н. с. лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Заку-
 сова», Москва, Российская Федерация

Oxana G. Gribakina

e-mail: pron-ox@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4604-4346>
 SPIN code: 6266-8161
 PhD, Cand. Sci. (Biology), research scientist of the
 laboratory of pharmacokinetics FSBI “Zakusov In-
 stitute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federa-
 tion

Кольванов Геннадий Борисович

e-mail: 7822535@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>
 SPIN-код: 2538-8639
 д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Заку-
 сова», Москва, Российская Федерация

Gennadiy B. Kolyvanov

e-mail: 7822535@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>
 SPIN code: 2538-8639
 Dr. Sci. in Biology, leading researcher of the labora-
 tory of pharmacokinetics FSBI “Zakusov Institute
 of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Литвин Александр Алексеевич

Автор, ответственный за переписку
 e-mail: litbiopharm@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>
 SPIN-код: 6193-5770
 д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусо-
 ва», Москва, Российская Федерация

Alexander A. Litvin

Corresponding author
 e-mail: litbiopharm@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>
 SPIN code: 6193-5770
 Dr. Sci. in Biology, Leading researcher of the
 laboratory of pharmacokinetics FSBI “Zakusov
 Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian
 Federation

Бочков Павел Олегович

e-mail: bok-of@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8555-5969>
 SPIN-код: 5576-8174
 к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
 В.В. Закусова», Москва, Российская Федерации

Pavel O. Bochkov

e-mail: bok-of@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8555-5969>
 SPIN code: 5576-8174
 PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Officer
 of laboratory pharmacokinetics FSBI “Zakusov
 Insti-tute of Pharmacology”, Moscow, Russian
 Federation

Поварнина Полина Юрьевна

e-mail: povarnina@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>
 SPIN-код: 5498-6724
 к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных
 биорегуляторов отдела химии лекарственных
 средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
 В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Polina Yu. Povarnina

e-mail: povarnina@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>
 SPIN code: 5498-6724
 PhD, Cand. Sci. (Biology), senior researcher of the
 Laboratory of peptide bioregulators of the Depart-
 ment of Chemistry of Medicines, FSBI “Zakusov
 Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian
 Federation

Жердев Владимир Павлович

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>

SPIN-код: 2213-9592

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Vladimir P. Zherdev

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>

SPIN code: 2213-9592

Dr. Sci. (Med.), professor, Head of laboratory pharmaco-cokinetics FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Пирадов М.А., Максимова М.Ю., Танашиан М.М. Инсульт Пошаговая инструкция. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019. 288 с. [Piradov MA, Maximova MYu, Tanashyan MM. Insult. Poshagovaya instruktsiya. Moscow: GEOTAR-Media; 2020. (In Russ.)].
2. Liaw N, Liebeskind D. Emerging therapies in acute ischemic stroke. *F1000Res*. 2020 Jun 5;9:F1000 Faculty Rev-546. DOI: 10.12688/f1000research.21100.1.
3. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Патент РФ — RU2410392C2, 2011. [Seredenin SB, Gudasheva TA. Patent RF — RU2410392C2, 2011. (In Russ.)]. <https://patentimages.storage.googleapis.com/75/fa/e7/322e854039eb0f/RU2410392C2.pdf>
4. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В. и др. Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF активируют PLC-γ1. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2020;494(1):486-490. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Nikolaev SV, et al. Dipeptide mimetics of different NGF and BDNF loops activate PLC-γ1. *Doklady Rossiyskoy Akademii nauk. Yauki o zhizni*. 2020;494(1):486-490. (In Russ.)]. DOI: 10.31857/s2686738920050133.
5. Gudasheva TA, Povarnina PY, Antipova TA, et al. Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction. *J Biomed Sci*. 2015 Dec 8;22:106. DOI: 10.1186/s12929-015-0198-z.
6. Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Исследование *in vitro* нейропротективных свойств нового оригинального миметика фактора роста нервов ГК-2. *Бюлл. экп. биол. Мед*. 2010;150(11):537-540. [Antipova TA, Gudasheva TA, Seredenin SB. *In vitro* study of neuroprotective properties of a new original nerve growth factor mimetic GC-2. *Bull. exp. biol. Med*. 2010;150(11):537-540 (In Russ.)].

7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. С. 865-880 [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif and K; 2012;865-880. (In Russ.)].
8. Мирошниченко И.И. Основы фармакокинетики. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2002. 282 с. [Miroshnichenko II. *Osnovy pharmacokinetiki*. Moscow: GEOTAR-Media; 2002. (In Russ.)].
9. Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. *Доклады Академии Наук*. 2010;434(4):549-552. [Antipova TA, Gudasheva TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2010;434(4):549-552. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S160767291005011X.
10. Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Блынская Е.В. и др. Количественное определение гексаметилендиаминдиамид бис-(N-моно-сукцинил-L-глутамил-L-лизина) в плазме крови с использованием ВЭЖХ-МС. *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*. 2019;60(3):194-197. [Litvin AA, Kolyvanov GK, Blynskaya EV, et al. Quantification of hexamethylenediaminediamide bis-(N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine) in the blood plasma by HPLC-MS. *Vestnik Moscovskogo Universiteta. Seria 2. Khimia*. 2019;60(3):194-197. (In Russ.)].
11. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. М.: Издательство РАМН; 2003. 302 с. [Sergienko VI, Gelliff R, Bondareva IB. *Prikladnaya Pharmacokinetika*. Moscow: Izdatelstvo RAMN; 2003. (In Russ.)].
12. Evans G. *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. CRC Press. 2004. 425 p.

Сопоставление приёмов расчёта фармакокинетических параметров в исследованиях с дизайном «ЖИВОТНОЕ-ТОЧКА»

© *Косман В. М., Карлина М. В., Макарова М. Н., Макаров В. Г.*

АО «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмолово, Российская Федерация

Аннотация. При исследовании фармакокинетики (ФК) лекарственных средств с применением мелких лабораторных животных, прежде всего грызунов, часто используют дизайн эксперимента «животное-точка», предполагающий отбор биологического материала после эвтаназии животного. Актуальным является вопрос обработки экспериментальных данных и способ расчёта ФК параметров, в ситуации, когда все значения концентраций получены от разных особей. **Цель исследования.** Сопоставление приёмов расчёта фармакокинетических параметров в исследованиях фармакокинетики с дизайном «животное-точка». **Материалы и методы.** Для ряда исследований, проведённых нами ранее с использованием в качестве тест-систем самцов аутбредных крыс, был выполнен ретроспективный анализ данных и расчёт ФК параметров тремя различными способами: по средним значениям концентраций на каждой временной точке (способ 1); по данным, полученным для животных с одинаковыми порядковыми номерами в подгруппах, соответствующих временным точкам (способ 2); с применением ресемплинга, основанного на моделировании индивидуальных ФК-профилей (способ 3). Параметры фармакокинетики (максимальная концентрация — C_{max} , время достижения максимальной концентрации — T_{max} , площадь под кривой «концентрация—время» — AUC_{0-t} , среднее время пребывания в организме — MRT , период полувыведения — $T_{1/2}$) рассчитаны внекомпартментным методом статистических моментов с использованием валидированного приложения PKSolver для Microsoft Office Excel. **Результаты.** Сопоставление полученных результатов не позволило выявить какие-либо закономерности и предпочтения применения того или иного способа расчёта ФК параметров в зависимости от исследованных препаратов, пути и кратности введения. Для всех оценённых ФК параметров (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , MRT , $T_{1/2}$) получены близкие значения и/или интервалы, что свидетельствовало о корректности применения рассмотренных способов расчёта. **Заключение.** На основании сопоставления преимуществ и недостатков рассматриваемых способов расчёта, показано, что оптимально применение способа 2, являющегося частным случаем ресемплинга (способа 3) с минимальным количеством репликаций. Акцентирование использованного способа расчёта ФК параметров при описании методологии исследований важно для совершенствования их качества.

Ключевые слова: фармакокинетика; крысы; дизайн животное на временную точку; расчёт параметров

Для цитирования:

Косман В. М., Карлина М. В., Макарова М. Н., Макаров В. Г. Сопоставление приёмов расчёта фармакокинетических параметров в исследованиях с дизайном «животное-точка». *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):19–27. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-19-27>

Поступила: 03.05.2023. **В доработанном виде:** 13.05.2023. **Принята к печати:** 25.05.2023. **Опубликована:** 30.09.2023.

Comparison of pharmacokinetic parameters calculation techniques in studies with animal-point design

© Vera M. Kosman, Marina V. Karlina, Marina N. Makarova, Valery G. Makarov

Research and manufacturing company "Home of Pharmacy" JSC, Leningrad oblast, Vsevolozhskiy district, Kuzmolovskiy t.s., Russian Federation

Abstract. In pharmacokinetics (PK) studies of medicinal products with small laboratory animals models, primarily rodents, the design of the animal-point experiment is often used, involves the selection of biological material after euthanasia of the animal. The question of experimental data processing and the PK parameters calculation method in a situation where all concentration values are obtained from different individuals is relevant. **Purpose of the study.** Comparison of pharmacokinetic parameters calculation methods in studies with the animal-point design. **Materials and methods.** For a number of previously conducted studies with male outbred rats test systems, a retrospective data analysis was performed and PK parameters were calculated in three different ways: from the average concentration values at each time point (method 1); from data obtained for animals with the same sequence numbers in subgroups corresponding to time points (method 2); using resampling based on modeling of individual PK profiles (method 3). Pharmacokinetic parameters (maximum concentration — C_{max} , time to reach maximum concentration — T_{max} , area under the curve "concentration-time" — AUC_{0-t} , average time to stay in the body — MRT , half-life — $T_{1/2}$) were calculated by non-compartment method of statistical moments using the validated PKSolver application for Microsoft Office Excel. **Results.** The comparison of the obtained results did not reveal any patterns and preferences for the use of a particular method of calculating PK parameters depending on the studied drugs, route and administration way. For all evaluated PK parameters (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , MRT , $T_{1/2}$), similar values and/or intervals were obtained, which indicated the correctness of all considered calculation methods. **Conclusion.** Based on advantages and disadvantages of the calculation methods comparison it is shown that it is optimal to use method 2, which is a special case of reception (method 3) with a minimum number of replications. It is important to emphasize the method of PK parameters calculation when describing the methodology of studies to improve their quality.

Keywords: pharmacokinetics; rats; animal per time point design; parameters calculation

For citations:

Kosman VM, Karlina MV, Makarova MN, Makarov VG. Comparison of pharmacokinetic parameters calculation techniques in studies with animal-point design. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):19–27. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-19-27>

Received: 03.05.2023. **Revision received:** 13.05.2023. **Accepted:** 25.05.2023. **Published:** 30.09.2023.

Введение / Introduction

При исследовании фармакокинетики (ФК) лекарственных средств с применением мелких лабораторных животных, прежде всего грызунов, часто используют дизайн эксперимента «животное-точка», предполагающий отбор биологического материала после эвтаназии животного. Этот приём является классическим и встречается в литературе и нормативной документации как репликативный, дискретный, терминальный (replicate, discrete, terminal) дизайн [1]. Его применение обусловлено, прежде всего, ограниченным объёмом биоматериала, который можно отобрать у одного животного прижизненно на каждой временной точке, его соответствием количеству необходимому для дальнейшего анализа, а также особенностями отбора биоматериала у конкретного биологического вида (например, тромбированием хвостовой вены у крыс), препятствующими повторному отбору биоматериала от одной особи. Несмотря на тенденции к минимизации количества биоматериала, необходимого для анализа, развитие специальных техник для отбора и работы с пробами биоматериала от грызунов [1–4], позволяющими получить полную ФК кривую от одной особи, дизайн «животное-точка» остаётся востребованным в практической работе. Он незаменим в исследованиях, предусматривающих отбор тканей и органов на всех временных точках для оценки распределения действующего вещества исследуемого препарата.

При использовании дизайна «животное-точка», согласно регуляторным документам, необходимо задействовать не менее 5 животных на каждую временную точку [5]. С учётом необходимости отбора биоматериала не менее, чем на 10 точках, минимальное число животных для изучения фармакокинетики одного препарата в одной дозе составляет 50 особей. Увеличение числа животных на каждую временную точку нецелесообразно с этической и экономической точек зрения, поскольку вероятнее всего не приведёт к получению более качественного, достоверного результата, характеризующегося уменьшением вариабельности значений ФК параметров по сравнению с минимальным дизайном [6].

Вместе с тем, актуальным является вопрос обработки экспериментальных данных и способ расчёта ФК параметров в ситуации, когда все значения концентраций получены от разных особей. Очевидно, что в этом случае невозможно получить индивидуальные ФК кривые от каждого животного и рассчитать индивидуальные значения ФК параметров [1]. Поэтому для анализа таких разреженных (рассеянных или скудных, sparse [7, 8]) данных возможно применение специализированного моделирования и методов, разработанных для оценки популяционной фармакокинетики. Эти методы имеют различный диапазон сложности: от простого объединения (пулирования) данных до комплексного нелинейного моделирования смешанных

эффектов (NONMEM) и байесовского моделирования [1, 9, 10]. Среди встречающихся в литературе методов можно выделить два основных способа:

– расчёт ФК параметров по средним значениям концентраций для каждой временной точки или так называемый пуловый метод [4, 8, 11],

– и так называемый ресемплинг, предполагающий замещение недостающих данных из полученного в исследовании набора значений [8, 12].

В качестве ещё одного варианта рассмотрен расчёт по значениям концентраций, полученным для животных с одинаковым порядковым номером из каждой подгруппы (временной точки). Данный способ в течение многих лет использован нами в практике ФК исследований, служивших основой ряда публикаций [13–15].

Цель данной работы — сопоставление приёмов расчёта фармакокинетических параметров в исследованиях фармакокинетики с дизайном «животное-точка».

Материалы и методы / Materials and methods

Для ряда исследований, проведённых в АО «НПО ДОМ ФАРМАЦИИ» в 2020–2022 гг. с использованием в качестве тест-систем самцов аутбредных крыс, был выполнен ретроспективный анализ данных и расчёт ФК параметров тремя различными способами: 1 — по средним значениям концентраций на каждой временной точке; способ 2 — по данным, полученным для животных с одинаковыми порядковыми номерами в подгруппах, соответствующих временным точкам; способ 3 — ресемплинг, основанный на моделировании индивидуальных ФК-профилей.

При выполнении биологических частей соответствующих исследований для изучения одного препарата в одной дозе формировали группы по 50 животных. Каждая группа включала по десять подгрупп (по числу временных точек) по 5 животных в каждой подгруппе. Каждому отобранному в исследование животному присваивали индивидуальный номер, состоящий из трёх регистров: первая часть кодировала номер группы (например, 1); вторая — номер подгруппы (1–10); третья — номер животного в подгруппе (1–5).

Сопоставление способов расчёта ФК параметров выполнено на примере данных, полученных для плазмы крови.

Параметры фармакокинетики (максимальная концентрация — C_{max} , время достижения максимальной концентрации — T_{max} , площадь под кривой «концентрация–время» — AUC_{0-t} , среднее время пребывания в организме — MRT, период полувыведения — $T_{1/2}$) рассчитаны внемоделным методом статистических моментов [16] с использованием валидированного приложения PKSolver для Microsoft Office Excel. При расчётах индивидуальных значений ФК параметров по способу 2 использовали данные для всех животных с одинаковыми номерами (1–5) из каждой подгруппы (временной точки).

Процедура ресемплинга (способ 3) выполнена аналогично алгоритму, приведённому авторами работы [8]: первым пяти животным были присвоены значения концентраций, полученные при анализе экспериментальных проб. Значения концентраций для следующих животных были выбраны случайным образом из имеющихся 5 значений. Процедура аналогична для каждой временной точки и была реализована с помощью стандартного пакета программ Microsoft Office Excel с применением функции:

=ИНДЕКС(В3:F3;СЛУЧМЕЖДУ(1;СЧЁТ(В3:F3))),

где интервал В3:F3 — ячейки, соответствующие экспериментальным значениям.

Общее число значений концентраций для каждой временной точки составило 50 (5 экспериментальных и 45 сгенерированных с помощью процедуры ресемплинга) и соответствовало общему числу животных в экспериментальной группе. На основании полученных массивов концентраций выполнен расчёт индивидуальных значений ФК параметров.

Для обработки данных применена описательная статистика, рассчитаны средние арифметические значения (\bar{X}) и соответствующие им стандартные отклонения (SD). Статистический анализ выполнен с помощью лицензированного программного обеспечения (ПО, Prism 9, GraphPad Software, США).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

В ретроспективную обработку данных включены исследования 7 различных препаратов, предполагавших различные способы введения — внутривенное, подкожное, пероральное; в том числе, с различной кратностью введения — однократное и многократное. Результаты расчёта ФК параметров тремя способами приведены в табл. 1. Полученные данные не позволили выявить какие-либо закономерности и предпочтения применения того или иного способа расчёта ФК параметров в зависимости от препаратов, пути и кратности введения.

При сопоставлении ФК параметров, рассчитанных тремя способами, практически во всех случаях и для всех оценённых ФК параметров (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , MRT, $T_{1/2}$) получены близкие значения и/или интервалы, перекрывающиеся в пределах погрешностей (стандартных отклонений). Некоторые отличия от общей картины можно отметить для параметров MRT и $T_{1/2}$ препаратов 6 и 7 (№ п/п 11 и 13 в табл. 1): значения, полученные способами 1 и 3, близки между собой, а средние значения, рассчитанные по способу 2 — несколько выше. Однако за счёт сравнительно больших стандартных отклонений значений, рассчитанных способами 2 и 3, их интервалы $\bar{X} \pm SD$ перекрываются.

К числу очевидных недостатков способа 1 следует отнести отсутствие стандартных отклонений, поскольку невозможно рассчитать индивидуальные значения ФК параметров и оценить разброс данных, связанный, в том числе, с индивидуальными особенностями животных. Вместе с тем, данный способ наиболее простой и экономичный с точки зрения временных затрат, что обуславливает его применение многими авторами (например, [17–23]). Он позволяет получить общую информацию о ФК параметрах исследуемого объекта в условиях эксперимента, однако сравнение данных для нескольких групп (например, получавших один препарат в разных дозах и т. п.) затруднительно [8].

При использовании способа 2 наиболее уязвимым аспектом являлось присвоение животным номеров внутри подгруппы (временной точки). В эксперименте распределение животных по группам и подгруппам проводили методом модифицированной блочной рандомизации [24, 25] с использованием генератора случайных чисел, что обеспечивало рандомность распределения. Присвоение порядкового номера внутри подгруппы (1–5) производили произвольно. При таком подходе ключевым оказывается вопрос — изменятся ли средние значения ФК параметров, если поменять местами животных внутри одной или каждой подгруппы. Косвенным образом на этот вопрос отвечает применение ресемплинга, позволяющего смоделировать различные сочетания значений концентраций. Сопоставление полученных нами данных свидетельствовало о том, что эти перестановки не приводили к изменению общей ФК картины как на примере ФК профилей (рис. 1), так и на примере средних значений основных ФК параметров (см. табл. 1), рекомендуемых для оценки [5, 26].

Способ 2 требует несколько больших затрат времени на обработку данных по сравнению со способом 1, по крайней мере в варианте использованного нами ПО — надстройки PKSolver для Microsoft Office Excel. Преимуществом данного инструмента является его доступность и простота использования по сравнению с различными специализированными программами для расчёта ФК параметров и совместимость с общеупотребительным ПО (Microsoft Office Excel). Значимым преимуществом способа 2 является возможность получить средние значения рассчитываемых ФК параметров, провести статистическую обработку данных и оценить вариабельность ФК параметров, которая может быть важна в дальнейшем для планирования клинических исследований.

Ресемплинг (способ 3) является примером, так называемого байесовского моделирования. Наряду с приёмами NONMEM его используют в популяционной ФК при анализе небольшого количества данных (от 1), полученных от одного субъекта [1]. Для выполнения такого рода моделирования зачастую необходимо применение специальных пакетов программ, появление которых способствовало развитию

Таблица 1

Показатели фармакокинетики в плазме крови крыс, рассчитанные различными способами ($\bar{X} \pm SD$)

Table 1

Rat plasma pharmacokinetics parameters calculated by various methods ($\bar{X} \pm SD$)

№ п/п	Исследование	Способ расчёта ¹	C _{max} , мкг/мл	T _{max} , ч	AUC _{0-t} ч×мкг/мл	MRT, ч	T _{1/2} , ч
1	Однократное внутрижелудочное введение препарата 1	1	119,6	2,0	1801	26,4	17,4
		2	136±10	3,6±2,6	1801±312	28,6±8,9	18,8±6,5
		3	133±15	3,8±2,6	1798±248	27,0±9,2	17,5±6,2
2	Однократное накожное нанесение препарата 2 на неповреждённую поверхность кожи	1	2,7	1,0	8,6	3,2	1,6
		2	3,4±1,9	1,3±1,0	8,6±3,6	2,9±0,3	1,9±1,5
		3	3,2±1,7	1,9±1,0	9,1±3,5	3,6±1,6	1,9±0,4
3	Многokrатное накожное нанесение препарата 2 на неповреждённую поверхность кожи	1	1,8	0,8	8,3	5,5	6,5
		2	2,1±0,3	2,0±0,8	8,1±1,3	5,4±1,2	6,2±2,6
		3	2,0±0,3	1,6±0,7	8,0±1,1	5,4±1,3	5,8±2,4
4	Однократное накожное нанесение препарата 2 на повреждённую поверхность кожи	1	0,92	0,8	3,5	4,9	3,0
		2	1,2±0,4	0,9±0,1	3,6±1,0	5,1±2,2	3,8±1,9
		3	1,2±0,3	1,3±0,6	3,6±0,6	5,8±2,9	3,8±2,5
5	Многokrатное накожное нанесение препарата 2 на повреждённую поверхность кожи	1	0,9	3,0	6,2	6,1	3,6
		2	1,1±0,1	2,0±1,0	6,2±0,7	7,2±1,8	4,1±1,7
		3	1,1±0,1	1,6±0,7	6,3±0,5	6,4±2,5	4,0±1,8
6	Однократное внутрижелудочное введение препарата 3	1	0,5	3,0	2,1	4,8	3,0
		2	0,6±0,2	1,9±1,1	2,1±0,6	6,6±3,0	4,5±2,4
		3	0,6±0,2	1,7±1,0	2,2±0,4	6,4±2,0	4,0±1,5
7	Многokrатное внутрижелудочное введение препарата 3	1	1,1	1,0	2,7	3,3	2,4
		2	1,5±1,3	1,8±0,8	2,7±1,3	5,3±2,1	4,0±2,2
		3	1,6±1,3	1,7±0,7	2,8±1,4	5,1±2,3	3,2±1,4
8	Однократное внутрижелудочное введение препарата 4	1	59,7	0,5	177,6	2,6	2,7
		2	61,4±6,0	0,9±0,7	177,6±16,3	2,4±0,3	1,4±0,1
		3	62,5±5,6	0,7±0,4	178,9±16,9	2,5±0,3	1,6±0,9
9	Многokrатное внутрижелудочное введение препарата 4	1	32,3	1,0	101,9	2,2	1,3
		2	38,2±8,2	1,5±0,7	101,9±11,2	2,2±0,1	1,3±0,1
		3	37,1±6,2	1,2±0,6	100,8±9,0	2,3±0,2	1,3±0,1
10	Однократное наружное нанесение препарата 5	1	1,1	1,0	2,9	5,1	3,1
		2	1,2±0,6	1,2±0,5	2,9±0,9	7,7±7,6	4,7±4,3
		3	1,0±0,5	1,4±0,5	2,6±0,8	6,4±4,1	3,8±2,4
11	Однократное наружное нанесение препарата 6, действующее вещество 1	1	0,8	1,0	2,2	6,6	4,1
		2	0,9±0,5	1,2±0,5	2,2±0,8	11,5±7,8	5,6±4,4
		3	1,0±0,5	1,7±0,7	2,5±0,7	6,2±2,6	4,1±1,5
12	Однократное наружное нанесение препарата 6, действующее вещество 2	1	10,5	4,0	238,3	27,9	17,1
		2	12,2±3,1	3,6±1,7	224,5±84,7	57,7±31,8	44,5±25,1
		3	12,6±2,1	3,6±1,6	220,0±43,9	63,9±45,4	48,7±34,5
13	Однократное подкожное введение препарата 7	1	0,4	1,0	1,3	9,4	6,4
		2	0,5±0,2	1,0±0,6	1,3±0,5	15,1±14,5	10,1±10,0
		3	0,5±0,2	1,7±1,4	1,4±0,3	9,8±9,5	6,2±6,3

Примечания: ¹ — способ 1 — по средним значениям концентраций; способ 2 — по животным с одинаковыми порядковыми номерами (n = 5); способ 3 — ресемплинг (n = 50).

Notes: ¹ — method 1 — by average concentration values; method 2 — for animals with the same sequence numbers (n = 5); method 3 — resampling (n = 50).

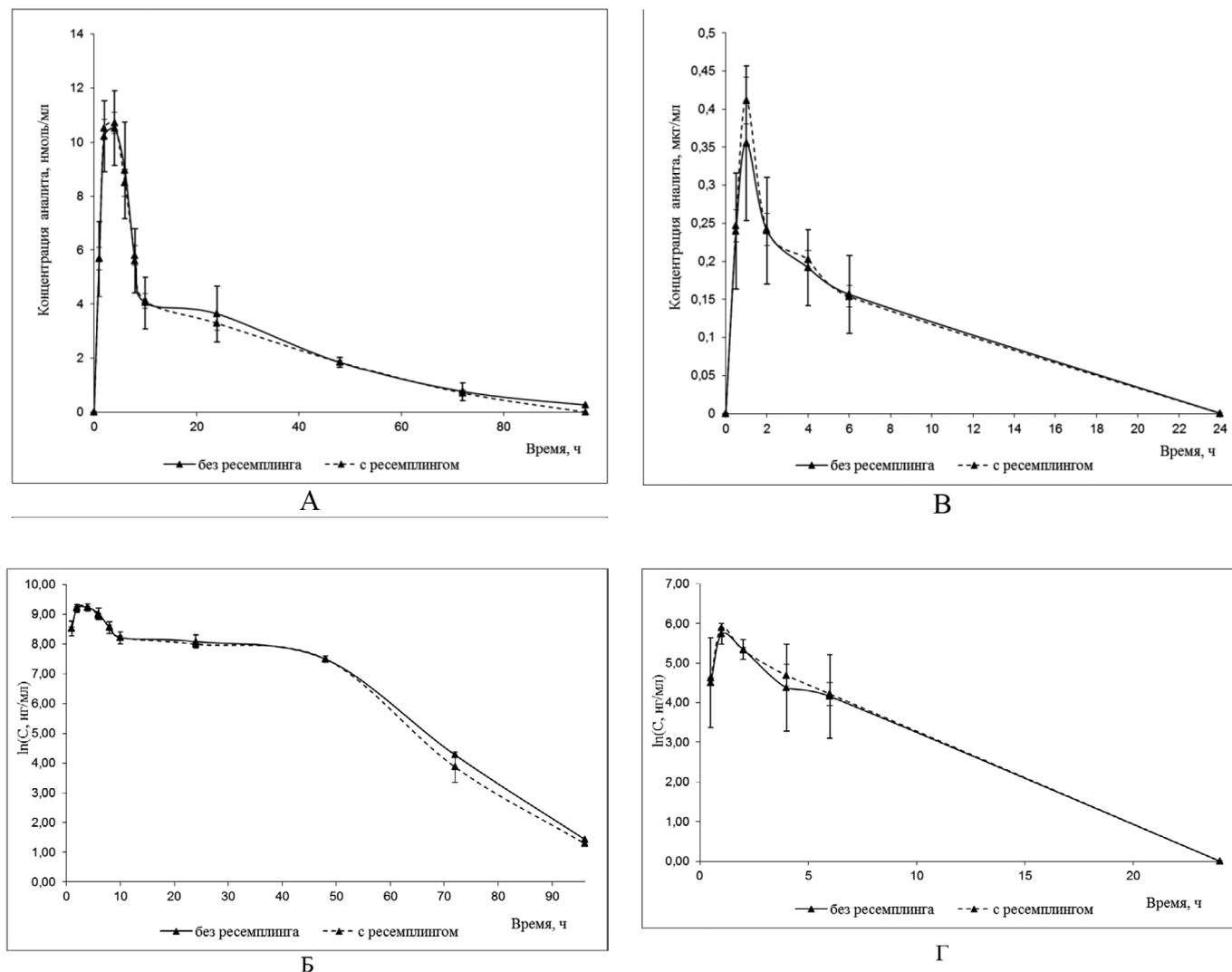


Рис. 1. Сопоставление ФК профилей, полученных при обработке данных по способам 1 и 2 (без ресемплинга, $n = 5$) и способу 3 (с ресемплингом, $n = 50$) для препаратов 6 (А, Б) и 7 (В, Г, исследования 12 и 13 согласно табл. 1) в линейных (А, В) и линейно-логарифмических (Б, Г) координатах (ФК профили, получаемые по способу 1, полностью совпадали с получаемыми по способу 2)

Fig. 1. Comparison of PK profiles obtained after data processing by methods 1 and 2 (without resampling, $n = 5$) and method 3 (resampling, $n = 50$) for drugs 6 (A, B) and 7 (B, D, studies 12 and 13 according to table 1) in linear (A, C) and linear-log (B, D) coordinates (PK the profiles obtained by method 1 were completely the same as those obtained by method 2)

и применению этих приёмов [27]. В нашем случае, как и авторами работы [8], ресемплинг был реализован наиболее простым и доступным методом — с помощью пакета Microsoft Office Excel.

Существенными недостатками данного способа, на наш взгляд, являются:

1. Лабильность результатов расчёта. При каждом новом открытии расчётного файла в ПО Microsoft Office Excel происходило обновление результатов расчёта с использованием функции, приведённой в разделе Материалы и методы. Фиксировать результат ресемплинга оказалось возможным, только путём копирования данных в новые ячейки с помощью функции «вставить как значения». Таким образом, сочетание

концентраций для каждого индивидуального животного, на основании которого далее выполняли расчёт ФК параметров, являлось результатом субъективной остановки «перебора» возможных сочетаний (в момент копирования). Такая особенность данного способа ведёт к возможной невоспроизводимости результатов расчётов (например, при воспроизведении расчётов другим специалистом).

2. Трудозатратность. Даже в минимальном варианте этот способ наиболее затратен по времени (по крайней мере, в варианте использованного ПО) — необходимо обсчитать 50 индивидуальных ФК кривых (вместо 5 при выборе способа 2). Как и авторы [8], мы использовали количество модельных (сгенерирован-

ных) ФК-профилей такое же, как и число животных, задействованных в эксперименте (что, с нашей точки зрения, логично). Вместе с тем, теоретически возможное количество сочетаний (в нашем случае — по 5 значений для 10 временных точек, в работе [8] — по 6 значений для 6 временных точек, в работе [12] — по 3 значения для 6 временных точек) значительно больше.

Отмеченные недостатки способа 3 снижают привлекательность этого приёма расчёта, учитывая, что с его помощью получены результаты близкие к данным более простого и экспрессного способа 2. Преимущества многократного ресемплинга не очевидны.

В литературе можно встретить несколько примеров сопоставления алгоритмов получения некоторых ФК параметров при проведении исследований с использованием в качестве тест-систем мелких лабораторных животных (грызунов). Так, авторы [4] на примере трёх анализов группы нестероидных противовоспалительных препаратов сопоставляют значения основных ФК параметров (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t}), полученные с применением двух основных дизайнов — «животное-точка» (в терминологии авторов — разреженный или sparse дизайн) и отбор биоматериала на всех временных точках у каждого животного (в терминологии авторов — серийный дизайн). В первом случае расчёт ФК параметров выполнен на основании средних значений концентраций на каждой временной точке, во втором — на основании полных ФК профилей от каждого животного. Получение близких, практически совпадающих значений трёх ключевых ФК параметров (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t}) позволило авторам подтвердить корректность предложенного ими способа отбора и обработки биопроб малого объёма (менее 50 мкл) при проведении ФК исследований с использованием мышей.

В работе [11] сопоставлены результаты определения тканевой доступности при наличии разреженных (sparse) данных с помощью различных алгоритмов расчёта. Традиционный подход предполагает определение тканевой доступности (ft), как отношения значения AUC в ткани (AUC_T) к соответствующей величине AUC в плазме. Авторы использовали простое усреднение данных по концентрациям на разных временных точках (native data averaging approach, аналогично рассмотренному выше способу 1) и различные приёмы увеличения размера выборки на базе имеющихся данных за счёт ресемплинга и перестановки — метод случайной выборки (или рандомизации проб, random sampling approach) и метод псевдопрофильного бутстрепа (pseudoprofile bootstrap). Приведённые авторами данные свидетельствовали о том, что все способы расчёта приводили к получению близких средних значений определяемого параметра (ft), а увеличение количества репликации от 5–10 до 1000 практически не приводило к изменению (снижению) значений стандартных отклонений значений определяемого параметра (табл. 2). Авторы рекомендовали

Таблица 2

Данные по оценке тканевой доступности (по материалам [12])

Table 2

Tissue availability data (based on materials [12])

Метод расчёта	Число репликаций (циклов ресемплинга, n)	Результат ($\bar{X} \pm SD$)
Усреднение данных (native data averaging approach)	Не применимо	17,05
Метод случайной выборки (random sampling approach)	5	16,64±0,88
	10	17,51±0,85
	50	17,17±0,95
	1000	17,09±0,87
Метод псевдопрофильного бутстрепа (pseudoprofile bootstrap)	5	Нет данных
	10	15,76±0,41
	50	16,71±0,83
	1000	17,18±0,78

применение метода случайной выборки (аналогичен рассмотренному выше способу 3) с количеством циклов ресемплинга равному общему числу животных, использованных в эксперименте для получения разреженных данных. Вместе с тем, использованный нами выше способ 2 (по животным с одинаковыми порядковыми номерами) можно рассматривать как частный случай ресемплинга с минимальным числом репликаций (циклов ресемплинга) (в нашем случае — равным 5, в общем случае — числу животных на каждой временной точке).

Косвенно это согласуется с позицией автора работы [11], получившего (на примере инъекционного введения 7 соединений) значения ряда ФК параметров (клиренс — CL , объём распределения — V_{ss} и период полувыведения — $T_{1/2}$) на основании данных от 5–10 субъектов и 1–2 проб крови от каждого субъекта. По его мнению, отбор по 1 пробе от 5 субъектов является минимально необходимым объёмом экспериментального материала в ходе педиатрических исследований, являющихся примером исследований с очень маленькими выборками (разреженными или рассеянными, sparse выборками).

Необходимо подчеркнуть, что авторы публикаций не всегда указывают способ расчёта ФК параметров при использовании дизайна «животное-точка». Так, в работах [17–21] однозначно подчеркнуто, что расчёт выполнен по средним значениям. При ознакомлении с работами [22, 23] об этом можно догадаться по отсутствию стандартных отклонений для значений ФК параметров. Авторы работ [13–15] также не придавали значения данному аспекту и не подчеркивали с помощью какого приёма были получены индивидуальные значения ФК параметров, которые затем усреднены для представления в публикациях. Единственным моментом, позволяющим восстановить эту информацию, являлось указание числа усреднённых значений (n),

как правило, равнявшееся 5 (числу животных на каждую временную точку). А вот при анализе работ [28, 29] восстановить или предположить использованный способ расчёта не представляется возможным — образцы биоматериала отбирали при эвтаназии животных, данные по ФК параметрам представлены в виде средних значений и соответствующих стандартных отклонений, а число усреднённых значений не указано. Полагаем, что более детальное освещение данного элемента статистической обработки данных при представлении результатов ФК исследований такого рода было бы крайне важным и полезным, способствовало бы повышению качества работ и соблюдению принципов GLP, предусматривающих полноту и прослеживаемость информации [30, 31].

Заключение / Conclusion

На основании ретроспективной обработки данных ряда исследований, с использованием дизайна «животное-временная точка», выполнен расчёт ФК параметров различными способами — по средним значениям концентраций, по животным с одинаковыми порядковыми номерами и с применением ресемплинга.

Сопоставление полученных результатов не позволило выявить какие-либо закономерности и предпочтения применения того или иного способа расчёта ФК параметров в зависимости от исследованных препаратов, пути и кратности введения. Для всех оценённых ФК параметров (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} , MRT, $T_{1/2}$) получены близкие значения и/или интервалы, что свидетельствовало о корректности применения рассмотренных способов расчёта. На основании сопоставления преимуществ и недостатков рассматри-

ваемых способов расчёта, оптимальным представляется расчёт по данным, полученным для животных с одинаковыми порядковыми номерами в подгруппах, соответствующих временным точкам, который является частным случаем ресемплинга с минимальным количеством репликаций.

Акцентирование использованного способа расчёта ФК параметров при описании методологии исследований важно для совершенствования их качества.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Сведения о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Участие авторов. *Косман В. М.* — расчёт фармакокинетических параметров, подготовка публикации; *Карлина М. В.* — обсуждение способов оценки фармакокинетических параметров; *Макарова М. Н.* — критический пересмотр содержания статьи; *Макаров В. Г.* — критический пересмотр содержания статьи и утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Participation of authors. *Kosman VM* — pharmacokinetic parameters calculation, publication preparing; *Karlina MV* — results discussion; *Makarova MN* — manuscript critical revision; *Makarov VG* — critical revision of the content of the article and approval of the final version of the article for publication.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Косман Вера Михайловна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: kosman.vm@doclinika.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>

к. фарм. н., руководитель химико-аналитической лаборатории, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмолowo, Российская Федерация

Vera M. Kosman

Corresponding author

e-mail: kosman.vm@doclinika.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>

PhD, Cand. Sci. (Pharm), head of analytical laboratory, "RMC "HOME OF PHARMACY" JSC, Leningrad oblast, Vsevolozhskiy district, Kuzmolovskiy t.s., Russian Federation

Карлина Марина Валерьевна

e-mail: karlina.mv@doclinika.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>

к. б. н., руководитель отдела технологии, кинетики и анализа лекарственных средств, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмолово, Российская Федерация

Макарова Марина Николаевна

e-mail: makarova.mn@doclinika.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

д. м. н., директор, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмолово, Российская Федерация

Макаров Валерий Геннадиевич

e-mail: makarov.vg@doclinika.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

д. м. н., профессор, научный руководитель АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмолово, Российская Федерация

Marina V. Karlina

e-mail: karlina.mv@doclinika.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>

PhD, Cand. Sci. (Biolog), head of department of technology, kinetics and analysis of drugs, "RMC "HOME OF PHARMACY" JSC, Leningrad oblast, Vsevolzhskiy district, Kuzmolovskiy t.s., Russian Federation

Marina N. Makarova

e-mail: makarova.mn@doclinika.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>

Dr. Sci (Med.), director, "RMC "HOME OF PHARMACY" JSC, Leningrad oblast, Vsevolzhskiy district, Kuzmolovskiy t.s., Russian Federation

Valery G. Makarov

e-mail: makarov.vg@doclinika.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

Dr. Sci (Med.), Professor, scientific supervisor, "RMC "HOME OF PHARMACY" JSC, Leningrad oblast, Vsevolzhskiy district, Kuzmolovskiy t.s., Russian Federation

Список литературы / References

1. Valic MS, Halim M, Schimmer P, Zheng G. Guidelines for the experimental design of pharmacokinetic studies with nanomaterials in preclinical animal models. *J Control Release*. 2020 Jul 10;323:83–101. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.04.002.
2. Joyce AP, Wang M, Lawrence-Henderson R, et al. One mouse, one pharmacokinetic profile: quantitative whole blood serial sampling for biotherapeutics. *Pharm Res*. 2014 Jul;31(7):1823–1833. DOI: 10.1007/s11095-013-1286-y.
3. Liu L, Cao B, Aa J, et al. Prediction of the pharmacokinetic parameters of triptolide in rats based on endogenous molecules in pre-dose baseline serum. *PLoS One*. 2012;7(8):e43389. DOI: 10.1371/journal.pone.0043389.
4. Raje AA, Mahajan V, Pathade VV, et al. Capillary microsampling in mice: effective way to move from sparse sampling to serial sampling in pharmacokinetics profiling. *Xenobiotica*. 2020 Jun;50(6):663–669. DOI: 10.1080/00498254.2019.1683259.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Миронов А. Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. CHast' pervaya. Mironov AN Moscow: Grif i K, 2012. (In Russ).]
6. Косман В.М., Карлина М.В. Ретроспективная оценка вариабельности фармакокинетических параметров в зависимости от биологического вида и числа особей в экспериментальной группе. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2023; 1. [Kosman VM, Karlina MV. Retrospective of pharmacokinetic parameters variability in dependence on biological species and number of individuals in the experimental group. *Laboratory Animals for Science*. 2023; 1. (In Russ).] DOI: 10.57034/2618723X-2023-01-06.
7. Gabrielsson J, Weiner D. Non-compartmental Analysis. In: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). *Methods Mol Biol*. 2012;(929):377–389. DOI:10.1007/978-1-62703-050-2_16.
8. Мирошниченко И.И., Симонов А.Н., Кузьмин И.И., Платова А.И. Анализ рассеянных данных в фармакокинетических исследованиях. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2020;(2):28–33. [Miroshnichenko II,

Simonov AN, Kuzmin II, Platova AI. Analysis of sparse data in pharmacokinetic studies. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2020;(2):28–33. (In Russ).] DOI: 10.37489/2587-7836-2020-2-28-33.

9. van Bree J, Nedelman J, Steimer J-L, et al. Application of Sparse Sampling Approaches in Rodent Toxicokinetics: A Prospective View. *Drug Information Journal*. 1994;28(1):263–279. DOI: 10.1177/009286159402800134

10. Wang T, Baron K, Zhong W, et al. Bayesian approach to estimate AUC, partition coefficient and drug targeting index for studies with serial sacrifice design. *Pharm Res*. 2014 Mar;31(3):649–659. DOI: 10.1007/s11095-013-1187-0.

11. Mahmood I. Naive pooled-data approach for pharmacokinetic studies in pediatrics with a very small sample size. *Am J Ther*. 2014 Jul-Aug;21(4):269–274. DOI: 10.1097/MJT.0b013e31824ddee3.

12. Chu HM, Ette EI. A random sampling approach for robust estimation of tissue-to-plasma ratio from extremely sparse data. *AAPS J*. 2005 Sep 2; 7(1):E249–58. DOI: 10.1208/aapsj070124.

13. Pozharitskaya ON, Shikov AN, Faustova NM, et al. Pharmacokinetic and Tissue Distribution of Fucoidan from *Fucus vesiculosus* after Oral Administration to Rats. *Mar Drugs*. 2018 Apr 18;16(4):132. DOI: 10.3390/md16040132.

14. Shikov AN, Pozharitskaya ON, Faustova NM, et al. Pharmacokinetic Study of Bioactive Glycopeptide from *Strongylocentrotus droebachiensis* After Intranasal Administration to Rats Using Biomarker Approach. *Mar Drugs*. 2019 Oct 11;17(10):577. DOI: 10.3390/md17100577.

15. Косман В.М., Демченко Д.В., Джайн (Корсакова) Е.А. и др. Исследование фармакокинетики оригинального лекарственного средства для лечения ВИЧ-1 инфекции. *Фармация*. 2021;70(4):48–56. [Kosman VM, Demchenko DV, Jain (Korsakova) EA, et al. Investigation of the pharmacokinetics of an original drug for the treatment of HIV-1 infection. *Pharmacy*. 2021;70(4):48–56. (In Russ).] DOI: 10.29296/25419218-2021-04-08.

16. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed*. 2010 Sep;99(3):306–314. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007.

17. Beconi MG, Howland D, Park L, et al. Pharmacokinetics of memantine in rats and mice. *PLoS Curr*. 2011 Dec 15;3:RRN1291. DOI: 10.1371/currents.RRN1291.
18. Жердев В.П., Бойко С.С., Блынская Е.В. и др. Доклиническое изучение фармакокинетики нового анксиолитика дипептидной структуры ГБ-115. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2015;(1):52–59. [Zherdev VP, Boyko SS, Blynskaya EV, et al. Preclinical study the pharmacokinetics new anxiolytic drug of dipeptide structure GB-115. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2015;(1):52–59. (In Russ).].
19. Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А. и др. Сравнительное изучение фармакокинетики метаболита тропоксина у различных видов животных и человека. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2017;(2):30–34. [Zherdev VP, Kolyvanov GB, Litvin AA, et al. Pharmacokinetic comparative study of tropoxine metabolite in miscellaneous animal species and humans. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2017;(2):30–34. (In Russ).].
20. Раскин С.Ю., Колыванов Г.Б., Литвин А.А. и др. Фармакокинетика дипептидного анксиолитика ГБ-115 после перорального введения у различных видов животных и человека. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2017;(3):20–25. [Raskin SYu, Kolyvanov GB, Litvin AA, et al. Pharmacokinetics of dipeptide anxiolytic GB-115 after oral administration in different animals species and humans. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2017;(3):20–25. (In Russ).].
21. Ковалёв Г.И., Золотарёв Ю.А., Дадаян А.К. и др. Изучение фармакокинетики [3H]-циклопролилглицина в крови крыс. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2018;(3):48–56. [Kovalev GI, Zolotarev YuA, Dadayan AK, et al. The Study of [3H]-Cyclopropylglycine Pharmacokinetics in Rat Blood. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2018;(3):48–56. (In Russ).]. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10024.
22. Ноздрин В.И., Пьявченко Г.А., Иванова М.Е., Гузев К.С., Кузнецов С.Л. Изучение некоторых параметров фармакокинетики фенола, входящего в состав пасты с антисептиком-стимулятором Дорогова 3 фракции. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2019;8(3):57–61. [Nozdrin VI, Pivachenko GA, Ivanova ME, Guzev KS, Kuznetsov SL. Evaluation of pharmacokinetical parameters of phenol, a component of Dorogov's antiseptic-stimulator 3 fraction paste. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 57–61. (In Russ).]. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-57-61.
23. Борозденко Д.А., Ляхман Д.Н., Голубев Я.В. и др. Изучение фармакокинетики и нейропротекторной активности нового производного 4-фенилпирролидинона-2 в модели ишемического инсульта на животных. *Вестник РГМУ*. 2020;(1):51–58. [Borozdenko DA, Lyakhmun DN, Golubev YV, et al. Study of the new 4-phenylpyrrolidinone-2 derivative pharmacokinetics and neuroprotective effect in the ischemic stroke animal model. *Bulletin of RSMU*. 2020;(1):49–56.]. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.010.
24. Altman DG, Bland JM. How to randomize. *BMJ*. 1999;319(7211):703–704. DOI: 10.1136/bmj.319.7211.703.
25. Bland J.M. An Introduction to Medical Statistics. 3rd edition. New York: Oxford University Press, 2000. 422 p.
26. Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 22.12.2020 N 33 «О Руководстве по изучению токсикокинетики и оценке системного воздействия в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов». [Recommendation of the Board of the Eurasian Economic Commission dated 22.12.2020 N 33 «O Rukovodstve po izucheniyu toksikokinetiki i ocenke sistemnogo vozdeystviya v toksikologicheskikh issledovaniyah lekarstvennyh preparatov». (In Russ).]. URL: <https://www.alt.ru/tamdoc/20rk0033/>
27. Lee SY. Bayesian Nonlinear Models for Repeated Measurement Data: An Overview, Implementation, and Applications. *Mathematics*. 2022;10:898. DOI: 10.3390/math10060898.
28. Быков В.В., Леонов К.А., Серебров В.Ю., Удут В.В. Фармакокинетика циркулирующего пула антиагреганта индолинонового ряда. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2019;(3):44–51. [Bykov VV, Leonov KA, Serebrov VYu, Udut VV. Pharmacokinetics of an antiplatelet drug of indolinone series in the bloodstream. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2019;3:44–51. (In Russ).]. DOI: 10.31549/2542-1174-2019-3-44-51.
29. Быкова А.В., Быков В.В., Мотов В.С. и др. Фармакокинетические параметры сложноэфирного производного индометацина. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2020;(3):17–26. [Bykova AV, Bykov VV, Motov VS, et al. Pharmacokinetic parameters of an ester derivative of indomethacin. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2020;(3):17–26. (In Russ).]. DOI: 10.31549/2542-1174-2020-3-17-26.
30. Решение Совета ЕЭК №81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 г. [Decision of the EEC Council No. 81 «Ob utverzhdenii pravil nadlezhashchej laboratornoj praktiki Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza v sfere obrashcheniya lekarstvennyh sredstv» ot 03.11.2016. (In Russ).]. URL: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0081/>
31. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». [Interstate standard GOST 33044-2014 «Principy nadlezhashchej laboratornoj praktiki». (In Russ).]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200115791>.

Количественное определение циклического гуанозинмонофосфата (ц-ГМФ) в тканях крыс с помощью жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии

Попов Н. С.¹, Балабаньян В. Ю.^{2,1}, Колгина Н. Ю.¹,
Петров Г. А.¹, Донсков С. А.¹, Атаджанов И. Б.¹

¹ — ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России), Тверь, Российская Федерация

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

Аннотация. Актуальность. Циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат является вторичным внутриклеточным мессенджером, который играет ключевую роль во многих физиологических процессах. Количественное определение уровня ц-ГМФ в тканях лабораторных животных является актуальной задачей экспериментальной фармакологии и физиологии. **Цель** — разработка методики количественного определения циклического гуанозинмонофосфата в различных тканях крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. **Методы.** Выделение ц-ГМФ осуществляли путём гомогенизации биоматериала с деионизированной водой. Экстракцию ц-ГМФ из гомогенатов проводили с помощью метанола, в качестве внутреннего стандарта использовали ацикловир. Детектирование ц-ГМФ и ацикловира осуществляли с помощью масс-спектрометра Sciex QTrap 3200MD, хроматографическое разделение проводили с использованием ВЭЖХ Agilent Technologies 1260 Infinity II. В качестве элюента использовали метанол и деионизированную воду. **Результаты.** Детекцию ц-ГМФ осуществляли на основании MRM переходов m/z 346,2/152,1; 346,2/135,1, хроматографическое определение ц-ГМФ проводили в обращённо-фазовом режиме на колонке Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм. Время удерживания ц-ГМФ и ацикловира составило 7,85 и 7,45 минут, соответственно, при общей продолжительности хроматографического анализа 12 минут. Аналитический диапазон методики определения ц-ГМФ в гомогенатах составил 0,5–1000,0 пмоль/мл. Для апробации методики был проведён анализ содержания ц-ГМФ в тканях интактных крыс Wistar. **Заключение.** Разработанная биоаналитическая ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения ц-ГМФ полностью соответствует валидационным требованиям. Метрологические характеристики методики позволяют с высокой точностью оценить содержание ц-ГМФ в различных тканях крыс.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС; тандемная масс-спектрометрия; гуанозинмонофосфат; ц-ГМФ

Для цитирования:

Попов Н. С., Балабаньян В. Ю., Колгина Н. Ю., Петров Г. А., Донсков С. А., Атаджанов И. Б. Количественное определение циклического гуанозинмонофосфата (ц-ГМФ) в тканях крыс с помощью жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):28–38. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-28-38>

Поступила: 26.06.2023. В доработанном виде: 03.07.2023. Принята к печати: 17.07.2023. Опубликовано: 30.09.2023.

Quantitative determination of cyclic guanosine monophosphate (c-GMP) in rat tissues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry

Nikita S. Popov¹, Vadim Yu. Balabanyan², Natalya Yu. Kolgina¹, Gennady A. Petrov¹, Sergey A. Donskov¹, Ilyas B. Atadzhanov¹

¹ — FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

² — Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. Cyclic 3',5'-guanosine monophosphate is a secondary intracellular messenger that plays a key role in many physiological processes. Quantitative determination of the level of c-GMP in the tissues of laboratory animals is an urgent task of experimental pharmacology and physiology. **Purpose of the study.** Development of a method for the quantitative determination of cyclic guanosine monophosphate in various tissues of rats using high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. **Methods.** The biomaterial was homogenized with deionized water. Extraction of c-GMP from homogenates was performed with methanol, acyclovir was used as an internal standard. Detection of c-GMP and acyclovir was performed using a Sciex QTrap 3200MD mass spectrometer, chromatographic separation was performed using an Agilent Technologies 1260 Infinity II HPLC. The mobile phase was methanol and deionized water. **Results.** Detection of c-GMP was performed by MRM transitions m/z 346.2/152.1; 346.2/135.1, chromatographic determination of c-GMP was performed in reverse phase mode on an Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6×100 mm, 2.7 μm column. The retention time of c-GMP and acyclovir was 7.85 and 7.45 minutes, respectively, the total duration of the chromatographic analysis was 12 minutes. The analytical range of the procedure for determining c-GMP in homogenates was 0.5–1000.0 pmol/ml. The content of c-GMP in the tissues of intact Wistar rats was analyzed using the developed method. **Conclusion.** The developed bioanalytical HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of c-GMP fully complies with the validation requirements. The metrological characteristics of the method make it possible to estimate the content of c-GMP in various tissues of rats with high accuracy.

Keywords: HPLC-MS/MS; tandem mass spectrometry; guanosine monophosphate; c-GMP

For citations:

Popov NS, Balabanyan VYu, Kolgina NYu, Petrov GA, Donskov SA, Atadzhanov IB. Quantitative determination of cyclic guanosine monophosphate (c-GMP) in rat tissues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):28–38. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-28-38>

Received: 26.06.2023. Revision received: 03.07.2023. Accepted: 17.07.2023. Published: 30.09.2023.

Введение / Introduction

Циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат (ц-ГМФ) является вторичным внутриклеточным мессенджером, который играет ключевую роль во многих физиологических процессах [1–3]. Взаимодействие ц-ГМФ с зависимыми протеинкиназами, ионными каналами и фосфодиэстеразами приводит к развитию различных эффектов, включая расслабление гладкой мускулатуры сосудов [4], торможение активности тромбоцитов и макрофагов [5–7], снижение пролиферации фибробластов [8, 9], развитие гиперполяризации рецепторов сетчатки глаза [10, 11] и т. д. Кроме того, установлена роль ц-ГМФ в механизмах памяти и обучения [12], развитии психических расстройств [13, 14] и злокачественных новообразований [15–17], патогенезе воспаления и боли [18–20], образовании половых клеток [21] и др. Таким образом, актуальным является изучение физиологических и патологических процессов, протекающих с участием ц-ГМФ, а также разработка эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС), в основе фармакодинамики которых лежит влияние на обмен данного вещества. Известно, что изменение внутриклеточной концентрации ц-ГМФ является важной составляющей механизма действия таких ЛС, как донаторы оксида азота, ингибиторы фосфодиэстеразы, прямые стимуляторы растворимой гуанилатциклазы, ингибиторы неприлизина.

Таким образом, количественное определение уровня ц-ГМФ в тканях лабораторных животных является актуальной задачей экспериментальной фармакологии и физиологии. Сочетание точных и воспроизводимых методик количественного определения биологически активных веществ и экспериментальных моделей патологических состояний является важным инструментом для изучения патогенеза различных заболеваний, а также фармакодинамики, эффективности и безопасности новых ЛС на доклиническом этапе.

Количественный анализ ц-ГМФ в биологических образцах является нетривиальной задачей. Трудность определения данного вещества связана с его низким содержанием в интактных тканях, а также быстрым разрушением под действием фосфодиэстераз. В настоящее время известны такие методы количественного определения ц-ГМФ, как радиоиммуноанализ [22, 23] и высокоэффективная жидкостная хроматография, в том числе с масс-спектрометрическим детектированием. Однако, несмотря на достаточно высокую чувствительность, они имеют ряд недостатков, включая сложную и дорогостоящую процедуру пробоподготовки биоматериала с использованием твёрдофазной экстракции, а также применение меченных изотопами внутренних стандартов [24–26].

Цель исследования — разработка методики количественного определения циклического гуанозинмонофосфата в различных тканях крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Материалы и методы / Materials and methods

В процессе разработки методики использовали аналитический стандарт ц-ГМФ (Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate, Sigma Aldrich, США, CAS: 7665-99-8). В качестве внутреннего стандарта (IS) применяли ацикловир (Зовиракс, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, ГлаксоСмитКляйн Мэньюфэкчуринг, Италия) (рис. 1).

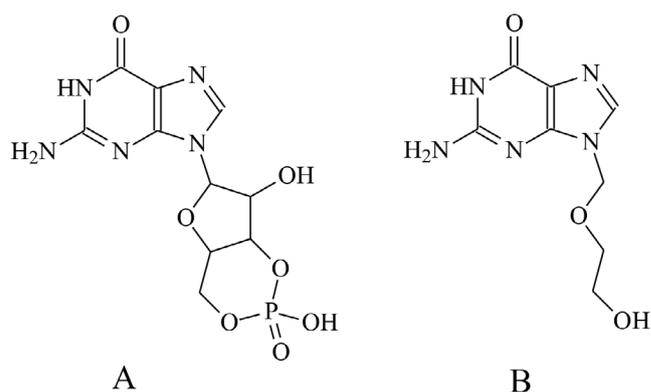


Рис. 1. Структурные формулы 3',5'-гуанозинмонофосфата (А) и ацикловира (В)

Fig. 1. Structural formulas of 3',5'-guanosine monophosphate (A) and acyclovir (B)

Исходные растворы ц-ГМФ и IS готовили на деионизированной воде (Milli-Q, сопротивление 18 МОм) в концентрации 4 мкмоль/мл и 25 мг/мл, соответственно. Полученный раствор ц-ГМФ являлся основой для приготовления серии разведений (рабочих растворов) на 50 % метаноле (Химмед, Россия), которые в дальнейшем были и использованы для получения калибровочных стандартов. Из исходного раствора ацикловира готовили экстрагент путём последовательных разведений 100 % метанолом до достижения концентрации 50 нг/мл.

Количественное определение ц-ГМФ проводили с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Германия) в обращённо-фазовом режиме с использованием аналитической колонки Poroshell InfinityLab 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм (Agilent Technologies, США) в сочетании с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 4,6×12,5 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США). Элюирование осуществляли смесью деионизированной воды и метанола с добавлением 10 мМ муравьиной кислоты в градиентном режиме.

Детектирование компонентов пробы при проведении хроматографического анализа осуществляли с помощью тандемного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex QTrap 3200 MD (Sciex, Сингапур), оснащённого электрораспылительным источником ионов. Подбор оптимальных параметров масс-спектрометрической

детекции проводили при непрерывном введении растворов ц-ГМФ и ацикловира с концентрацией 40 нг/мл (растворитель — 50 % метанол с добавлением 10 мМ муравьиной кислоты) в источник ионов с помощью шприцевого насоса со скоростью 10 мкл/мин. На первом этапе для ц-ГМФ и ацикловира определяли m/z протонированных молекул, подбирали оптимальные значения потенциала декластеризации (DP) и напряжения на входе в ячейку соударений (SFR). На втором этапе для установленных ионов-предшественников определяли масс-спектры ионов-продуктов, выбирали 2 характеристических иона, для которых подбирали оптимальные значения энергии столкновений (SE) и ускоряющего напряжения (SFR). Полученные значения были использованы для детекции ц-ГМФ и ацикловира в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) и обеспечивали достижение наилучшей чувствительности.

Пробоподготовка тканей крыс включала в себя несколько этапов: гомогенизацию с деионизированной водой, осаждение белков и последующее концентрирование супернатанта. Получение гомогенатов осуществляли следующим образом: в предварительно тарированную на аналитических весах ВЛ-124 (Госметр, Россия) пробирку типа Эппендорф объёмом 2 мл помещали фрагмент ткани, после определения точной массы добавляли деионизированную воду из расчёта 400 мкл на 100 мг ткани с помощью автоматического дозатора переменного объёма Eppendorf Research Plus (Германия), помещали шарик из кварцевого стекла диаметром 5 мм, после чего гомогенизировали на вибромельнице с частотой возвратно-поступательных движений 50 Гц и амплитудой 30 мм в течение 10 минут. Для увеличения выхода ц-ГМФ из биоматериала пробирки дополнительно выдерживали в ультразвуковой ванне (Мегеон, КНР) в течение 10 минут. На следующем этапе пробоподготовки осуществляли экстрагирование ц-ГМФ из полученных гомогенатов с одновременной депротеинизацией. Сравнивали степень извлечения ц-ГМФ из биоматериала при использовании в качестве экстрагента ацетонитрила, метанола, водных растворов сульфосалициловой и трифторуксусной кислот. Гомогенаты с извлекателем перемешивали в термостатируемом шейкере TS-100 C (Biosan, Латвия), удаление осаждённых белковых компонентов осуществляли с помощью центрифуги Sigma 1-14K (Германия). Так как в некоторых видах биоматериала могут наблюдаться низкие значения содержания ц-ГМФ, на следующем этапе пробоподготовки осуществляли концентрирование экстрактов путём высушивания в токе азота с помощью испарителя Miulab NDK200-1N (Китай) с последующим растворением сухого остатка в малом объёме подвижной фазы. Полученные растворы помещали в полиэтиленовые вставки в виалы и использовали для последующего хроматографического анализа.

Первичные данные хромато-масс-спектрометрического анализа обрабатывали с помощью про-

граммного обеспечения (ПО) AB Sciex Analyst 1.3.6, для расчёта значений валидационных параметров использовали ПО Microsoft Office Excel 365.

Разработанную методику валидировали по следующим параметрам: селективность, матричный эффект, перенос пробы, линейность аналитического диапазона, нижний предел количественного определения (НПКО), внутри- и межсерийная точность и прецизионность, стабильность на всех этапах анализа.

Для оценки пригодности разработанной методики проводили эксперимент *in vitro* по оценке влияния силденафила на сохранность ц-ГМФ в гомогенатах тромбоцитов крыс, используемых в качестве источника фосфодиэстераз. Крыс ($N = 6$) декапитировали, кровь в объёме 5 мл собирали в пробирки, содержащие цитрат натрия, после чего центрифугировали с помощью центрифуги LMC 4200R (Biosan, Латвия) при 300 g и температуре 10 °C в течение 15 минут. Обогащённую тромбоцитами плазму в объёме 1,5 мл переносили в пробирки, содержащие ЭДТА, и повторно центрифугировали при 1200 g и температуре 10 °C в течение 20 минут. Осадок тромбоцитов вместе с нижним слоем плазмы в объёме 0,5 мл помещали в ручной стеклянный гомогенизатор Поттера–Эльвейма и растирали в течение 90 секунд при одновременном воздействии ультразвука. 180 мкл полученного гомогената переносили в пробирки типа Эппендорф (1,5 мл), добавляли 20 мкл водного раствора ц-ГМФ (500 пмоль/мл), инкубировали в термостатируемом шейкере при температуре 37 °C в течение 30 минут, после чего проводили процедуру пробоподготовки для последующего хроматографического анализа. Сравнивали сохранность ц-ГМФ в гомогенате тромбоцитов, полученном от интактных крыс и животных, которые за 1 час до декапитации получали внутрижелудочно силденафил в дозе 1000 мг/кг. С этой целью проводили ВЭЖХ-МС/МС анализ полученных образцов до и после инкубации.

Разработанную методику использовали для количественной оценки содержания ц-ГМФ в тканях интактных крыс, концентрацию ц-ГМФ рассчитывали на 1 мг белка. С этой целью дополнительно проводили количественный анализ белка в гомогенатах с помощью реагента Total Protein Plus (ELITech Clinical Systems SAS, Франция).

Результаты / Results

Для ц-ГМФ и ацикловира (IS) были получены масс-спектры первого и второго (рис. 2) порядка, значения m/z фрагментарных ионов сравнивали с данными литературы [24–26]. Для аналита и внутреннего стандарта были выбраны два характеристических иона-продукта, для которых были подобраны условия детектирования, обеспечивающие максимальный ионный ток (табл. 1).

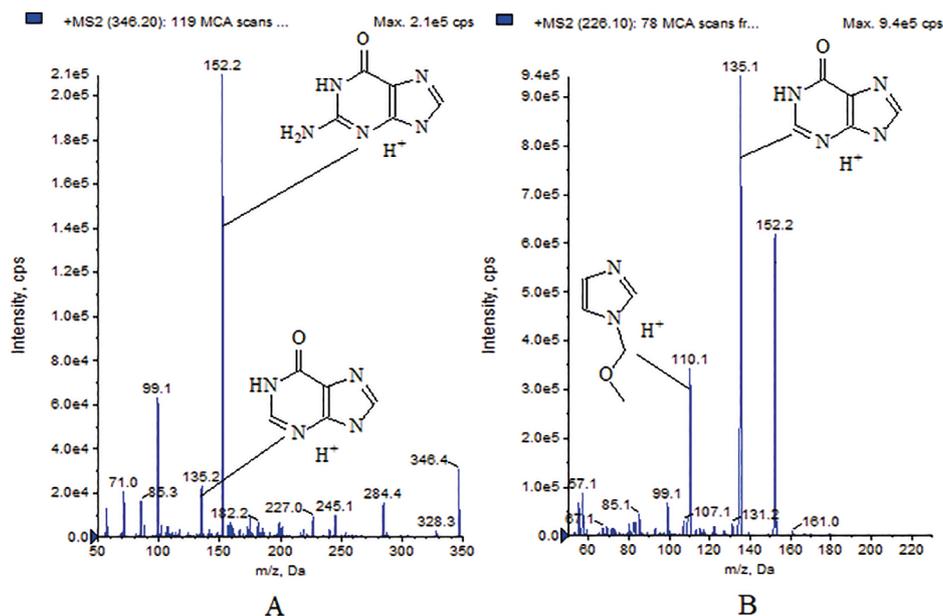


Рис. 2. Масс-спектры второго порядка ц-ГМФ (А) и ацикловира (В) в режиме регистрации положительных ионов
Fig. 2. MS/MS-spectra of c-GMP (A) and acyclovir (B) in the positive ion detection mode

Таблица 1

Параметры масс-спектрометрического детектирования ц-ГМФ и ацикловира в режиме MRM

Table 1

Parameters of mass spectrometric detection of c-GMP and acyclovir in MRM mode

Тип источника ионов				TurboIonSpray			
Режим ионизации				Положительный			
Температура источника ионов, °С				450,0			
Напряжение источника ионов, В				5 500,0			
Давление газа завесы, psi				15,0			
Давление газа-распылителя, psi				35,0			
Давление газа-нагревателя, psi				40,0			
	MRM, m/z	Dwell, мсек	DP, В	EP, В	CEP, В	CE, эВ	CXP, В
ц-ГМФ	346,2/152,1	100	65,0	5,0	16,0	27,0	2,5
	346,2/135,1				55,0	3,0	
Ацикловир (IS)	226,1/135,1	100	35,0	5,0	12,0	38,0	2,5
	226,1/110,1				39,0	3,3	

Хроматографическое определение ц-ГМФ осуществляли в обращённо-фазовом режиме. Использование метанола в качестве компонента подвижной фазы с большей элюирующей силой по сравнению с ацетонитрилом позволило получить более узкие и высокие пики как аналита, так и внутреннего стандарта. Кроме того, применение ацетонитрила существенно увеличивало нижний предел количественного определения ц-ГМФ, что не позволяло достичь необходимого уровня чувствительности. Таким образом, элюирование осуществляли смесью деионизированной воды (А)

и метанола (В) с добавлением 10 мМ муравьиной кислоты в градиентном режиме (табл. 2). Время удерживания ц-ГМФ и ацикловира составило 7,85 и 7,45 минут, соответственно, при общей продолжительности хроматографического анализа 12 минут (рис. 3).

По результатам оценки использования различных депротенизирующих агентов при пробоподготовке образцов гомогенатов тканей крыс было установлено, что использование метанола характеризуется наибольшими значениями степени извлечения ц-ГМФ, при этом эффективно удаляются мешающие компо-

ВЭЖХ-параметры определения ц-ГМФ

HPLC parameters for the determination of c-GMP

Хроматографическая колонка	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм			
Элюент А	Деионизированная вода + 10 мМ муравьиной кислоты			
Элюент В	Метанол + 10 мМ муравьиной кислоты			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мкл/мин	% А	% В
	0,0	400	95	5
	2,5		95	5
	4,0		5	95
	8,0		5	95
	8,01		98	2
12,0	98		2	
Температура колонки, °С	30			
Объём ввода, мкл	10			
Общее время анализа, мин	12			
Промывка инжектора	5 секунд, 25 % водный раствор метанола			

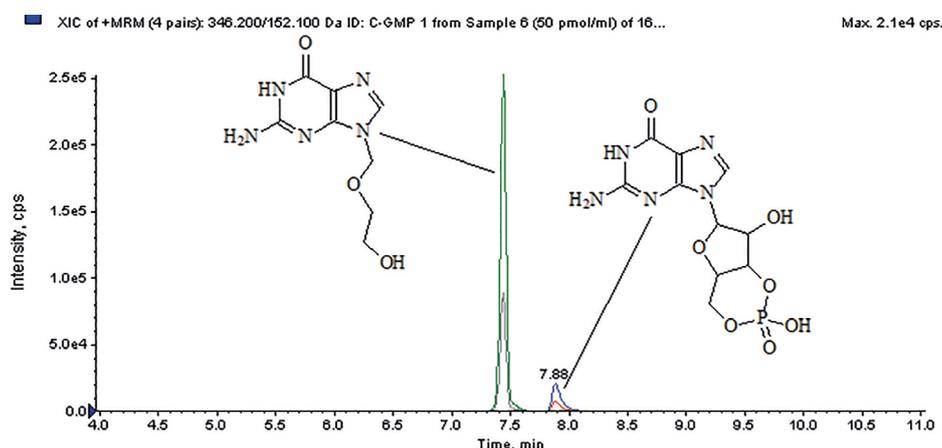


Рис. 3. Хроматограмма стандартного образца с концентрацией ц-ГМФ 50 пмоль/мл

Fig. 3. Chromatogram of a standard sample with a concentration of c-GMP 50 pmol/ml

Примечания: подвижная фаза — метанол и деионизированная вода с добавлением 10 мМ муравьиной кислоты; режим элюирования — градиентный; хроматографическая колонка — InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм; температура колонки — 30 °С; аликвота — 10 мкл.

Notes: mobile phase — methanol and deionized water with the addition of 10 mM formic acid; elution mode — gradient; chromatographic column — InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6×100 mm, 2.7 μm; temperature columns — 30 °C; aliquot — 10 μl.

ненты матрицы. Пробоподготовка для гомогенатов всех тканей была выполнена следующим образом: в пробирку Эппендорфа объёмом 1,5 мл с помощью автоматического дозатора вносили 100 мкл соответствующего гомогената, добавляли 400 мкл раствора ацикловира (50 нг/мл) в метаноле, выдерживали в термостатируемом шейкере при температуре 4 °С и частоте колебаний 1 400 в 1 минуту в течение 5 минут, после чего надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при ускорении 16000 g и температуре 4 °С в течение 15 минут. 400 мкл полученного супернатанта переносили в пробирки Эппендорфа объёмом 0,5 мл и высушивали в токе азота при комнатной температуре.

Сухой остаток растворяли в 50 мкл 5 % метанола, полученный раствор переносили в полиэтиленовые вставки для хроматографических виал и использовали для проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Для определения метрологических характеристик разрабатываемой методики была приготовлена и проанализирована серия стандартных образцов с содержанием ц-ГМФ: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 500,0 и 1000,0 пмоль/мл в пересчёте на гомогенат. По причине отсутствия свободной от ц-ГМФ биологической матрицы требуется доказательство возможности использования деионизированной воды в качестве её заменителя. С этой целью сравнивали коэффициенты

наклона калибровочных кривых, полученных по результатам анализа серии стандартных образцов, приготовленных на воде и на соответствующих гомогенатах. Кроме этого, калибровочную кривую, полученную по результатам анализа образцов, приготовленных на деионизированной воде, использовали для определения содержания ц-ГМФ в стандартных образцах, приготовленных на гомогенатах. Определяли разность между установленной по калибровочной зависимости концентрацией ц-ГМФ и концентрацией стандартных растворов с добавкой без учёта эндогенного уровня аналита [27]. Стандартные растворы получали путём добавления к 90 мкл деионизированной воды (или гомогената ткани) 10 мкл соответствующего 10-кратного рабочего раствора ц-ГМФ, после чего проводили пробоподготовку полученных образцов по вышеописанной методике [19].

По результатам эксперимента со стандартным добавлением было установлено, что значения коэффициента вариации разности концентраций для гомогенатов тканей крыс на протяжении всего аналитического диапазона составили от 5,8 до 11,4 %. Лишь для гомогената почек величина относительного стандартного отклонения была приближена к 15 %. Значения отношения коэффициентов наклона калибровочных кривых, полученных по результатам анализа образцов на деионизированной воде и гомогенатах тканей, составили от 0,912 до 1,08. Таким образом, использование калибровочных стандартных образцов, приготовленных на деионизированной воде, не будет существенно отражаться на правильности определения концентрации ц-ГМФ в биологических объектах.

Оценку селективности методики проводили путём сравнения отношений площадей хроматографических пиков двух ионов-продуктов ц-ГМФ и ацикловира

при анализе образцов на деионизированной воде и гомогенатах тканей. Было установлено, что на всех уровнях концентраций ц-ГМФ этот показатель не превышал 5 %, а для внутреннего стандарта (ацикловира) эти значения составили менее 1 %, что подтверждает высокую селективность разработанной методики.

На основании результатов анализа серии стандартных образцов была построена калибровочная кривая, отражающая зависимость отношения площади пика ц-ГМФ к площади пика ацикловира от концентрации ц-ГМФ в стандартном образце (рис. 4). Калибровочная зависимость представлена в виде уравнения линейной регрессии $y = 0,00285x + 0,0000719$ (нормирование $1/x^2$), коэффициент корреляции при этом составил 0,9992 (табл. 3).

Так как в природе отсутствует свободная от ц-ГМФ биологическая матрица, нижний предел количественного определения (НПКО) для ц-ГМФ оценивали по результатам хроматографического анализа аналитических стандартов, приготовленных на деионизированной воде. За НПКО принимали минимальное условное содержание ц-ГМФ в 1 мл гомогената ткани, которое может быть определено со значениями относительного стандартного отклонения и относительной погрешности не более 20 %, при этом отношение «сигнал–шум» на хроматограмме должно быть не менее 5:1. Значение НПКО для ц-ГМФ составило 0,5 пмоль/мл.

Для оценки переноса веществ во время хроматографического анализа сравнивали хроматограммы холостых проб, которые были проанализированы после шестикратного ввода образца с высокой концентрацией ц-ГМФ, с хроматограммами образцов с содержанием ц-ГМФ на уровне НПКО. По результатам анализа было установлено, что отношения площадей пиков в холостых образцах к площадям пиков в об-

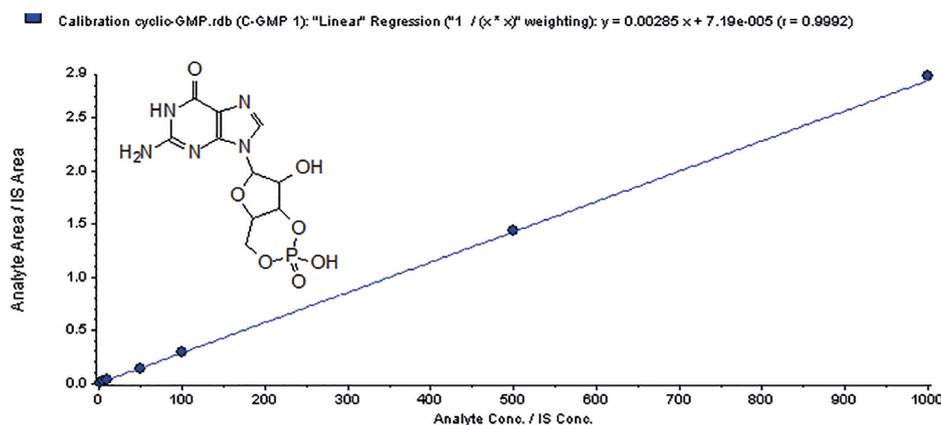


Рис. 4. Калибровочная кривая для количественного определения ц-ГМФ

Fig. 4. Calibration curve for the quantitative determination of c-GMP

Примечания: по горизонтальной оси представлена концентрация ц-ГМФ в гомогенате (пмоль/мл); по вертикальной оси — отношение площади хроматографического пика ц-ГМФ к площади пика IS — ацикловира.

Notes: the horizontal axis shows the concentration of c-GMP in the homogenate (pmol/ml), the vertical axis shows the ratio of the area of the chromatographic peak of c-GMP to the peak area of IS — acyclovir.

Таблица 3

Валидационные характеристики методики определения ц-ГМФ в гомогенатах тканей крыс

Table 3

Validation characteristics of the method for determining c-GMP in rat tissue homogenates

Аналитический диапазон, пмоль/мл		0,5 – 1000,0			
Уравнение регрессии		$y = 0,00285x + 0,0000719$			
r^2		0,9992			
Образец	НПКО 0,5 пмоль/мл	НК 45,0 пмоль/мл	СК 450,0 пмоль/мл	ВК 900,0 пмоль/мл	
Точность и прецизионность, серия 1 (Inter-day)					
Измеренная концентрация, пмоль/мл, mean±SD	0,422±0,054	41,44±1,76	457,8±27,5	871,4±19,1	
Точность, %	84,4	92,1	101,7	96,8	
CV, %	12,8	4,3	6,0	2,2	
Точность и прецизионность, серия 2 (Inter-day)					
Измеренная концентрация, пмоль/мл, mean±SD	0,410±0,039	42,06±3,64	477,8±10,2	910,4±27,1	
Точность, %	82,0	93,5	106,2	101,2	
CV, %	9,4	8,6	2,1	3,0	
Точность и прецизионность, серия 3 (Inter-day)					
Измеренная концентрация, пмоль/мл, mean±SD	0,412±0,044	39,92±1,87	431,0±19,2	872,2±35,8	
Точность, %	82,4	88,7	95,8	96,9	
CV, %	10,6	4,7	4,5	4,1	
Межсерийная точность и прецизионность (Intra-day)					
Измеренная концентрация, пмоль/мл, mean±SD	0,415±0,043	41,14±2,56	455,5±27,3	884,7±32,1	
Точность, %	82,9	91,4	101,2	98,3	
CV, %	10,3	6,2	6,0	3,6	

разцах НПКО были ниже максимально допустимого уровня (20 % для аналита и 5 % для IS).

Точность и прецизионность методики оценивали в трёх сериях путём анализа 5 контрольных образцов для четырёх уровней концентраций ц-ГМФ: НПКО, низкая концентрация (НК), средняя концентрация (СК), высокая концентрация (ВК). Точность была выражена в процентах — как отношение измеренной концентрации в контрольных образцах к номинальному содержанию ц-ГМФ (E). Прецизионность определяли по коэффициенту вариации (CV) результатов пятикратного определения концентрации ц-ГМФ. Критерием приемлемости считали значение CV и относительной погрешности для уровня НПКО не более 20 %, для остальных концентраций — не более 15 %. Результаты внутри- и межсерийной точности и прецизионности представлены в табл. 3.

Результаты оценки стабильности подтвердили сохранность исходных и рабочих растворов ц-ГМФ в течение 1 месяца. Контрольные образцы, получен-

ные путём добавления к гомогенатам тканей рабочих растворов ц-ГМФ до достижения высоких и низких концентраций, были стабильны в течение 1 часа при комнатной температуре. При повторном анализе таких образцов площадь хроматографических пиков не отличалась от первоначальных значений более чем на 15 %. Более длительное хранение приводило к потере содержания ц-ГМФ, что свидетельствует о необходимости немедленного проведения процедуры пробоподготовки или замораживания образцов. Так, хранение образцов при -80 °С позволило сохранить уровень ц-ГМФ в течение одной недели. Оценка пост-препаративной стабильности подтвердила сохранность готовых для хроматографического анализа проб в течение суток (максимальное время анализа всех образцов, находящихся в автосамплере хроматографа). Результаты исследования стабильности образцов после 3 циклов заморозки—разморозки показали значительную потерю содержания ц-ГМФ как для низких, так и для высоких концентраций, площадь

хроматографических пиков при повторном анализе таких образцов составляла от 20 до 34 % от первоначальных значений. Таким образом, достаточная точность определения ц-ГМФ в биологическом материале может быть обеспечена незамедлительным приготовлением гомогенатов из полученных фрагментов тканей с последующей процедурой пробоподготовки. В случае отсутствия возможности немедленно произвести депротеинизацию полученных гомогенатов, последние должны быть заморожены.

Апробацию разработанной методики проводили *in vitro* путём определения сохранности ц-ГМФ в гомогенизированной обогащённой тромбоцитами плазме крыс, которые заранее получали внутривенно силденафил в дозе 1000 мг/кг. Так, было установлено, что после инкубации образцов, приготовленных с использованием интактной плазмы, содержание

ц-ГМФ составило в среднем ($p < 0,05$) 17,6 % от первоначальных значений. Использование плазмы крыс, получавших силденафил, при прочих равных условиях позволило увеличить сохранность ц-ГМФ в образцах в среднем ($p < 0,05$) до 91,2 %. Примеры хроматограмм исследованных образцов приведены на рис. 5.

Обсуждение / Discussion

Разработанная методика была использована для анализа содержания ц-ГМФ в тканях интактных крыс Wistar ($N = 5$), содержащихся в виварии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России и выведенных из эксперимента в утренние часы путём декапитации. Результаты определения ц-ГМФ представлены в пересчёте на 1 мг белка (табл. 4) и сопоставимы с данными, полученными другими авторами [28–30].

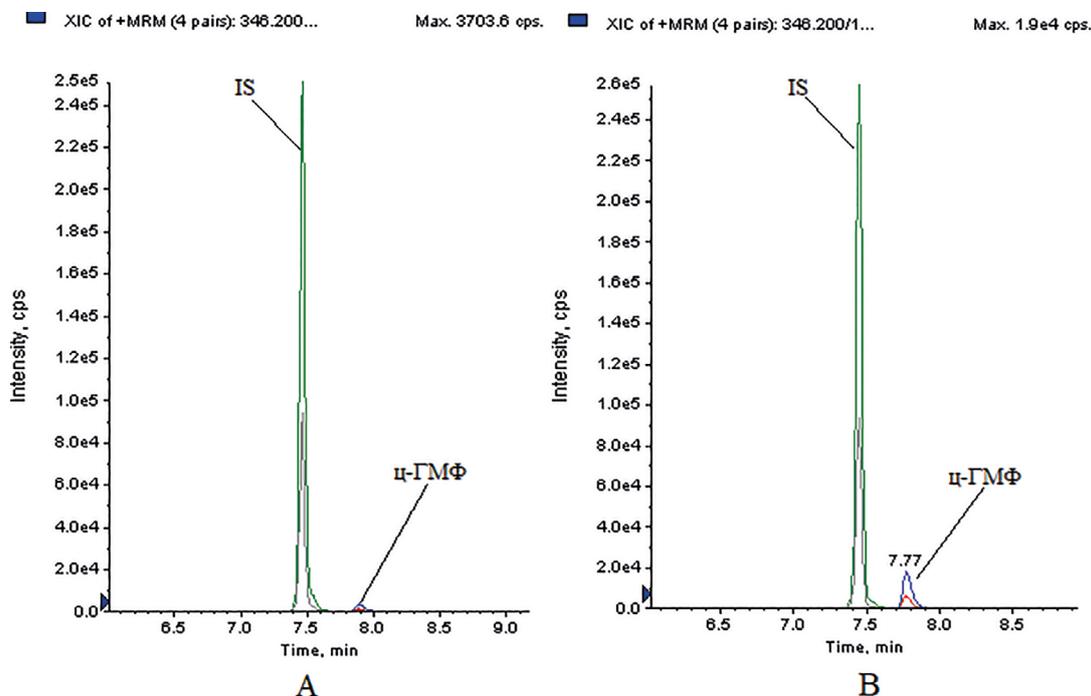


Рис. 5. Фрагменты хроматограмм образцов обогащённой тромбоцитами плазмы крыс с добавлением ц-ГМФ до достижения концентрации 50 пмоль/мл после инкубации в течение 30 минут при температуре 37 °С.

А — интактная плазма; В — плазма крыс, получавших силденафил

Fig. 5. Chromatogram fragments of platelet-rich plasma samples from rats with c-GMP concentration of 50 pmol/ml after incubation for 30 minutes at a temperature of 37 °С.

А — intact plasma; В — rat plasma with sildenafil

Таблица 4

Содержание ц-ГМФ в тканях интактных крыс Wistar

Table 4

Content of c-GMP in tissues of intact Wistar rats

Ткань	Фронтальная кора	Мозжечок	Сердце	Аорта	Печень	Почки	Лёгкие
Содержание ц-ГМФ, пмоль/мг белка ($M \pm m$)	3,96 $\pm 0,29$	20,40 $\pm 2,29$	1,87 $\pm 0,60$	2,36 $\pm 0,52$	24,14 $\pm 3,28$	1,74 $\pm 0,18$	1,99 $\pm 0,22$

Ограничения исследования / Limitations of the study

По мнению авторов, разработанная методика количественного определения ц-ГМФ в тканях крыс имеет ряд особенностей, ограничивающих её использование. К ним можно отнести малую распространённость масс-селективных детекторов для ВЭЖХ, а также отсутствие возможности оценивать уровень ц-ГМФ в динамике у одних и тех же лабораторных животных.

Заключение / Conclusion

Разработанная биоаналитическая ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения ц-ГМФ полностью соответствует валидационным требованиям. Метрологические характеристики методики позволяют с высокой точностью оценить содержание ц-ГМФ в различных тканях крыс, что несомненно является актуальным и востребованным в исследовании патологических процессов и механизма действия фармакологических средств.

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. *Попов Н. С.* — осуществлял разработку и валидацию биоаналитической методики; *Балабаньян В. Ю.* — отвечал за организационную часть исследования; *Колгина Н. Ю.*, *Петров Г. А.* — проводили анализ литературных источников и статистическую обработку полученных результатов; *Донсков С. А.*, *Атаджанов И. Б.* — осуществляли выделение и подготовку биологического материала; все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов.

Participation of authors. *Popov NS* — carried out the development and validation of the bioanalytical method; *Balabanyan VYu* — was responsible for the organizational part of the study; *Kolgina NYu*, *Petrov GA* — carried out the analysis of literary sources and statistical processing of the obtained results; *Donskov SA*, *Atajanov IB* — carried out the isolation and preparation of biological material; all authors participated in the discussion of the obtained results

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS**Попов Никита Сергеевич**

Автор, ответственный за переписку

e-mail: ns.popov@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1792-7414>

SPIN-код: 1974-7300

к. фарм. н., зав. научно-исследовательской лабораторией, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Nikita S. Popov

Corresponding author

e-mail: ns.popov@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1792-7414>

SPIN code: 1974-7300

PhD, Cand. Sci. Pharm., Head of Research Laboratory, Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Балабаньян Вадим Юрьевич

e-mail: bal.pharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

SPIN-код: 7351-7328

д. фарм. н., доцент, в. н. с., лаборатория трансляционной медицины, факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Vadim Yu. Balabanyan

e-mail: bal.pharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

SPIN code: 7351-7328

Dr. Sci. (Pharm), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Translational Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov MSU, Moscow, Russian Federation

Колгина Наталья Юрьевна

e-mail: natali_jbk@mail.ru

SPIN-код: 7231-0033

к. м. н., заведующая кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Natalya Yu. Kolgina

e-mail: natali_jbk@mail.ru

SPIN code: 7231-0033

PhD, Cand. Sci. Med., Head of Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Петров Геннадий Анатольевич

e-mail: petrov_gennadiy@mail.ru

SPIN-код: 3904-3405

к. м. н., доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Gennady A. Petrov

e-mail: petrov_gennadiy@mail.ru

SPIN code: 3904-3405

PhD, Cand. Sci. Med., Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Донсков Сергей Александрович

e-mail: donskov_s@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-5534>

SPIN-код: 1026-7460

к. с.-х. н., доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Sergey A. Donskov

e-mail: donskov_s@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-5534>

SPIN code: 1026-7460

PhD, Cand. Sci. Agricult., Associate Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Атаджанов Ильяс Борисович

e-mail: atadzanov.ilyas@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1995-2661>

препаратор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Ilyas B. Atadzhanov

e-mail: atadzanov.ilyas@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1995-2661>

preparator of the Department of Histology, Embryology and Cytology, FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Список литературы / References

1. Кобалава Ж.Д., Лазарев П.В. Значение сигнального пути “оксид азота — растворимая гуанилатциклаза — циклический гуанозинмонофосфат” в патогенезе сердечной недостаточности и поиске новых терапевтических мишеней. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(6):3035. [Kobalava ZD, Lazarev PV. Nitric oxide — soluble guanylate cyclase — cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in the pathogenesis of heart failure and search for novel therapeutic targets. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(6):3035. (In Russ.)]. DOI: 10.15829/1728-8800-2021-3035.
2. Jehle A, Garaschuk O. The Interplay between cGMP and Calcium Signaling in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 24;23(13):7048. DOI: 10.3390/ijms23137048.
3. Gao Y. Biology of vascular smooth muscle: vasoconstriction and dilation. *New York, NY, USA: Springer*. 2017;8:105. DOI: 10.1007/978-981-10-4810-4.
4. Lincoln TM. Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther*. 1989;41(3):479-502. DOI: 10.1016/0163-7258(89)90127-7.
5. Gambaryan S. The Role of NO/sGC/cGMP/PKG Signaling Pathway in Regulation of Platelet Function. *Cells*. 2022 Nov 21;11(22):3704. DOI: 10.3390/cells11223704.
6. Li Z, Liang Y, Zhang G, et al. An important stimulatory role for the cGMP-dependent protein kinase II in platelet activation, *in vivo* thrombosis and haemostasis. *Authorea*. 2020. DOI: 10.22541/au.160802063.39198387/v1.

7. Prasad H, Mathew JKK, Visweswariah SS. Receptor Guanylyl Cyclase C and Cyclic GMP in Health and Disease: Perspectives and Therapeutic Opportunities. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jun 29;13:911459. DOI: 10.3389/fendo.2022.911459.
8. Qin L, Zang M, Xu Y, et al. Chlorogenic Acid Alleviates Hyperglycemia-Induced Cardiac Fibrosis through Activation of the NO/cGMP/PKG Pathway in Cardiac Fibroblasts. *Mol Nutr Food Res*. 2021 Jan;65(2):e2000810. DOI: 10.1002/mnfr.202000810.
9. Chen Y, Zheng Y, Iyer SR, et al. C53: A novel particulate guanylyl cyclase B receptor activator that has sustained activity *in vivo* with anti-fibrotic actions in human cardiac and renal fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 2019 May;130:140–150. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.03.024.
10. Cantó A, Martínez-González J, López-Pedraja R, et al. Effect of nitric oxide inhibitors in retinitis pigmentosa. In *Nitric Oxide in Health and Disease*. *Academic Press*. 2023;289–303. DOI: 10.1016/B978-0-443-13342-8.00001-6.
11. Wucherpfennig S, Haq W, Popp V, et al. Using cGMP analogues to modulate photoreceptor light sensitivity: Perspectives for the treatment of retinal degeneration. *BioRxiv*. 2022;02. DOI: 10.1101/2022.02.07.478618.
12. Rosenbrock H, Giovannini R, Schänzle G, et al. The Novel Phosphodiesterase 9A Inhibitor BI 409306 Increases Cyclic Guanosine Monophosphate Levels in the Brain, Promotes Synaptic Plasticity, and Enhances Memory Function in Rodents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019 Dec;371(3):633–641. DOI: 10.1124/jpet.119.260059.

13. Sani G, Kotzalidis GD, Fiaschè F, et al. Second messengers and their importance for novel drug treatments of patients with bipolar disorder. *Int Rev Psychiatry*. 2022 Nov-Dec;34(7-8):736–752. DOI: 10.1080/09540261.2022.2119073.
14. Jehle A, Garaschuk O. The Interplay between cGMP and Calcium Signaling in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 24;23(13):7048. DOI: 10.3390/ijms23137048.
15. Kashgari FK, Ravna A, Sager G, Lyså R, Enyedy I, Dietrichs ES. Identification and experimental confirmation of novel cGMP efflux inhibitors by virtual ligand screening of vardenafil-analogues. *Biomed Pharmacother*. 2020 Jun;126:110109. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110109. Epub 2020 Mar 28. Erratum in: *Biomed Pharmacother*. 2022 Aug;152:113228.
16. Li M, Ji Y. Propranolol Inhibits the Growth of Cervical Cancer Cells by Inhibiting Cyclic Guanosine Monophosphate/Protein Kinase G (cGMP/PKG) Pathway. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 2022; 12(2):422–426. DOI: 10.1166/jbt.2022.2916.
17. Di Iorio P, Ronci M, Giuliani P, et al. Pros and Cons of Pharmacological Manipulation of cGMP-PDEs in the Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 27;23(1):262. DOI: 10.3390/ijms23010262.
18. Wang Z, Ma D, Xi Z. Cyclic dinucleotides: a new-generation drug for immune therapy. *Nucleic Acids in Medicinal Chemistry and Chemical Biology: Drug Development and Clinical Applications*. 2023;41–83. DOI: 10.1002/9781119692799.ch2.
19. Tan J, Wu B, Chen T, et al. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Tetrahydro- γ -carboline Derivatives as Potent Anti-inflammatory Agents Targeting Cyclic GMP-AMP Synthase. *J Med Chem*. 2021 Jun 10;64(11):7667–7690. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00398.
20. Fakhri S, Ahmadpour Y, Rezaei H, et al. The antinociceptive mechanisms of melatonin: role of L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP/KATP channel signaling pathway. *Behav Pharmacol*. 2020 Dec;31(8):728–737. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000579.
21. Baena V, Owen CM, Uliasz TF, et al. Cellular Heterogeneity of the Luteinizing Hormone Receptor and Its Significance for Cyclic GMP Signaling in Mouse Preovulatory Follicles. *Endocrinology*. 2020 Jul 1;161(7):bqaa074. DOI: 10.1210/endo/bqaa074.
22. Vente JD, Garssen J, Tilders FJ, et al. Single cell quantitative immunocytochemistry of cyclic GMP in the superior cervical ganglion of the rat. *Brain Res*. 1987 May 12;411(1):120–128. DOI: 10.1016/0006-8993(87)90688-3.
23. Yamamoto I, Tsuji J, Takai T, Fujimoto M. Double antibody enzyme immunoassay for the quantitation of adenosine 3', 5' -cyclic monophosphate (cyclic AMP) and guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cyclic GMP) in tissue and plasma. *J Immunoassay*. 1982;3(2):173–196. DOI: 10.1080/15321818208056994.
24. Van Damme T, Zhang Y, Lynen F, Sandra P. Determination of cyclic guanosine- and cyclic adenosine monophosphate (cGMP and cAMP) in human plasma and animal tissues by solid phase extraction on silica and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012 Nov 15;909:14–21. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.10.002.
25. Martens-Lobenhoffer J, Dautz C, Bode-Böger SM. Improved method for the determination of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in human plasma by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010 Feb 1;878(3-4):487–491. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.12.009.
26. Lorenzetti R, Lilla S, Donato JL, de Nucci G. Simultaneous quantification of GMP, AMP, cyclic GMP and cyclic AMP by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Nov 1;859(1):37–41. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.09.008.
27. Minkler PE, Stoll MS, Ingalls ST, et al. Quantification of carnitine and acylcarnitines in biological matrices by HPLC electrospray ionization-mass spectrometry. *Clin Chem*. 2008 Sep;54(9):1451–1462. DOI: 10.1373/jclinchem.2007.099226.
28. Kinscherf DA, Chang MM, Rubin EH, et al. Comparison of the effects of depolarizing agents and neurotransmitters on regional CNS cyclic GMP levels in various animals. *J Neurochem*. 1976 Mar;26(3):527–530. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1976.tb01506.x.
29. Veerappan R, Malarvili T. Chrysin Pretreatment Improves Angiotensin System, cGMP Concentration in L-NAME Induced Hypertensive Rats. *Indian J Clin Biochem*. 2019 Jul;34(3):288–295. DOI: 10.1007/s12291-018-0761-y.
30. Bojunga J, Dresar-Mayert B, Usadel KH, et al. Antioxidative treatment reverses imbalances of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 9;316(3):771–780. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.02.110.

Фармакологическая активность лактата кальция на модели дисбактериоза у крыс

© Полюга Н. Л.¹, Трофимец Е. И.¹, Боровкова К. Е.¹, Никифорова Л. Р.¹,
Салмова Ю. В.¹, Пелешок А. А.¹, Крышень К. Л.¹, Макарова М. Н.¹,
Колодкин А. М.², Митерева Д. Е.³, Касаткина И. С.³

¹ — АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Российская Федерация

² — Научное общество «Микробиота», Московская обл., Сергиево-Посадский район, Российская Федерация

³ — ООО «ЭЮЦ Клиник», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность. Под воздействием эндогенных и/или экзогенных факторов кишечная микрофлора, заселяющая все отделы желудочно-кишечного тракта, может меняться, что нарушает нормальное течение физиологических процессов, а в отдельных случаях приводит к тяжёлым патологическим состояниям. Одной из причин развития дисбактериоза кишечника является применение антибактериальных препаратов. Таким образом, поиск и разработка средств для профилактики и лечения дисбактериозов является актуальной задачей. **Цель.** Целью исследования являлась оценка эффективности кандидата в лекарственное средство на основе лактата кальция при многократном внутрижелудочном введении на модели антибиотик-индуцированного дисбактериоза у крыс. **Методы.** В исследовании использовали 40 самцов крыс линии Wistar (четыре группы по 10 животных). Была апробирована модель антибиотик-индуцированного дисбактериоза кишечника на крысах путём курсового внутрижелудочного введения комбинации амоксициллина и клавулановой кислоты в течение 7 дней в дозе 75 мг/кг. Развитие дисбиоза было подтверждено изменением количественного состава представителей кишечной микробиоты. Аналогично, в течение 7 дней вводили тестируемый препарат в дозах 5 мг/кг, 25 мг/кг, 125 мг/кг ежедневно спустя 2 часа после введения индуктора патологии. Контрольная группа получала 1 % раствор крахмала. **Результаты.** Пик развития дисбактериоза регистрировали на 4-й день индукции патологии. Применение лактата кальция в дозе 5 мг/кг не оказало значимого влияния, в то время как в группах, получавших кальция лактат в дозах 25 мг/кг и 125 мг/кг, отмечено статистически значимое (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) снижение выраженности патологического процесса по сравнению с группой негативного контроля. **Заключение.** По результатам данного исследования установлено, что применение лактата кальция в дозах 25 мг/кг и 125 мг/кг способствовало более быстрому исчезновению симптомов дисбактериоза и нормализации кишечной микробиоты в сравнении с животными, не получавшими лечение.

Ключевые слова: антибиотик-индуцированный дисбактериоз; крысы Wistar; *Lactobacterium* spp.; *Bifidobacterium* spp.; профилактика дисбиоза

Для цитирования:

Полюга Н. Л., Трофимец Е. И., Боровкова К. Е., Никифорова Л. Р., Салмова Ю. В., Пелешок А. А., Крышень К. Л., Макарова М. Н., Колодкин А. М., Митерева Д. Е., Касаткина И. С. Фармакологическая активность лактата кальция на модели дисбактериоза у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):39–49. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-39-49>

Поступила: 06.07.2023. В доработанном виде: 15.07.2023. Принята к печати: 25.07.2023. Опубликовано: 30.09.2023.

Pharmacological activity of calcium lactate on a model of dysbiosis in rats

© Nataliia L. Polyuga¹, Ekaterina I. Trofimets¹, Kristina E. Borovkova¹, Lia R. Nikiforova¹, Julia V. Salmova¹, Andrey A. Peleshok¹, Kirill L. Kryshen¹,
Marina N. Makarova¹, Alexei M. Kolodkin², Daria E. Mitereva³, Irina S. Kasatkina³

¹ — Research and manufacturing company "Home of Pharmacy", Leningrad region, Russian Federation

² — Scientific Society "Microbiota", Moscow region, Sergiev Posad district, Russian Federation

³ — "EUC Clinic" LLC, Moscow, Russian Federation

Abstract. Relevance. Under the influence of endogenous and/or exogenous factors, the intestinal microflora inhabiting all parts of the gastrointestinal tract may change, which disrupts the normal course of physiological processes, and in some cases leads to severe pathological conditions. One of the reasons for the development of intestinal dysbiosis is the use of antibacterial drugs. Thus, the search and development of means for the prevention and treatment of dysbiosis is an urgent task. **Goal.** The aim of the study was to evaluate the effectiveness of a candidate for a calcium lactate-based drug with repeated intragastric administration on a model of antibiotic-induced dysbiosis in rats. **Methods.** The study used 40 male Wistar rats (four groups of 10 animals each). A model of antibiotic-induced intestinal dysbiosis was tested in rats by a course of intragastric administration of a combination of amoxicillin and clavulanic acid for 7 days at a dose of 75 mg/kg. The development of dysbiosis was confirmed by a change in the quantitative composition of representatives of the intestinal microbiota. Similarly, for 7 days, the test drug was administered in doses of 5 mg/kg, 25 mg/kg, 125 mg/kg daily 2 hours after the introduction of the pathology inducer. The control group received a 1 % starch solution. **Results.** The peak of dysbiosis development was recorded on the 4th day of pathology induction. The use of calcium lactate at a dose of 5 mg/kg did not have a significant effect, while in the groups receiving calcium lactate at doses of 25 mg/kg and 125 mg/kg, there was a statistically significant (Mann-Whitney criterion, $p < 0.05$) decrease in the severity of the pathological process compared with the negative control group. **Conclusion.** According to the results of this study, it was found that the use of calcium lactate in doses of 25 mg/kg and 125 mg/kg contributed to a faster disappearance of symptoms of dysbiosis and normalization of the intestinal microbiota in comparison with animals that did not receive treatment.

Keywords: antibiotic-induced dysbacteriosis; Wistar rats; *Lactobacterium* spp.; *Bifidobacterium* spp.; prevention of dysbiosis

For citations:

Polyuga NL, Trofimets EI, Borovkova KE, Nikiforova LR, Salmova JV, Peleshok AA, Kryshen KL, Makarova MN, Kolodkin AM, Mitereva DE, Kasatkina IS. Pharmacological activity of calcium lactate on a model of dysbiosis in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):39–49. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-39-49>

Received: 06.07.2023. Revision received: 15.07.2023. Accepted: 25.07.2023. Published: 30.09.2023.

Введение / Introduction

Микробиота кишечника — это сложная и неоднородная система, населённая множеством микроорганизмов, включая бактерии, грибы, археи и вирусы, обитающих в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и взаимодействующих друг с другом, в том числе и с целым организмом-хозяином [1].

Разнообразие кишечной микрофлоры способствует здоровому функционированию органов и систем организма. Исследование кишечной микробиоты, помимо фундаментального значения, имеет актуальность в клиническом аспекте.

Наибольшая бактериальная обсеменённость наблюдается в толстом кишечнике, где отмечается преобладание анаэробов. Микрофлора толстого кишечника подразделяется на облигатную (главная, основная, резидентная), факультативную (сопутствующая, непостоянная, условно-патогенная) и транзиторную (случайная) [2] (рис. 1).

После рождения у человека формируется собственная микробиота в ЖКТ. Однако в течение жизни микрофлора подвергается воздействию различных факторов, таких как болезнь, психологический и физический стресс, радиация, лечение антибиотиками и нерациональное (неполноценное) питание, что приводит к нарушению микробиоценоза [3, 4]. Нарушение баланса микрофлоры может способствовать развитию дисбактериоза кишечника — изменение качественного и/или количественного состава микрофлоры кишечника, с последующим развитием метаболиче-

ских и иммунных нарушений с возможным развитием желудочно-кишечных расстройств [3, 5]. Нарушения нормальной микрофлоры кишечника характеризуются исчезновением или снижением количества облигатных её представителей, с одной стороны, и увеличением популяционного уровня условно-патогенных микробов, отсутствующих или встречающихся в ничтожных количествах в норме, — с другой. В результате дисбактериозных микробных изменений организм-хозяин не в состоянии обеспечивать защитные и физиологические функции микрофлоры, осуществляемые в условиях нормальной работы кишечника [6].

Множество заболеваний, включая воспалительные заболевания кишечника, а также нарушение обмена веществ, такие как ожирение и диабет II типа, связаны с дисбактериозом кишечника [7].

Наиболее выраженное отрицательное влияние на нормальную микрофлору кишечника оказывает лекарственная терапия, особенно нерациональная. Наибольшее действие на состав микрофлоры оказывают антибактериальные средства [8].

Для обозначения комплекса изменений в кишечнике и соответствующих клинических проявлений, связанных с дисбактериозом на фоне применения антибиотиков, в зарубежной литературе часто используется термин антибиотик-ассоциированная диарея (antibiotic associated diarrhea), эквивалентом которого, по существу, является термин «антибиотик-ассоциированный дисбактериоз кишечника» [9, 10]. По различным данным, полученным за последние 5 лет в мировой клинической практике, частота этого заболевания колеблется от 5 до 39 % [11–13].

На данный момент остаётся актуальным вопрос поиска и разработки средств терапии и профилактики, направленных на поддержание и/или восстановление здоровой микрофлоры кишечника. Помимо специализированной диеты, пребиотики и пробиотики являются наиболее часто используемыми препаратами, способствующими поддержанию гомеостаза кишечной микробиоты и восстановлению микробиологического баланса при его нарушении [14].

В арсенале лекарственных средств, направленных на восстановление нормальной микрофлоры, представлены пробиотики на основе живых микробов (бифидобактерии, лактобациллы, кишечная палочка и другие), пребиотики (неперевариваемые вещества, стимулирующие активность определённых микроорганизмов), синбиотики (комбинации пробиотиков и пребиотиков), а также микробные метаболиты (метаболитные пробиотики — метабиотики) [15]. Однако практика показала, что применение средств, направленных на восстановление микробиоты, не всегда обеспечивает требуемый терапевтический эффект для профилактики или лечения дисбактериозов. Это может быть обусловлено тем, что они являются «чужеродными» для микрофлоры конкретного человека. Также некоторые бактерии обитают в биоплёнках, благодаря



Рис. 1. Градация микрофлоры кишечника и микроорганизмы, входящие в её состав

Fig. 1. Gradation of the intestinal microflora and the microorganisms that make up it

чему становятся труднодоступными для действия препаратов. Сама по себе биоплёнка представляет собой образование, сформированное микроколониями микроорганизмов в форме башен или грибов (15–20 % объёма) и экзополимерного матрикса (75–85 % объёма) [16]. Иммуитет биоплёнки практически сводит на нет действие пробиотиков. Микроорганизмы, выращенные искусственно, являются инородными, они могут отторгаться макроорганизмом [17–19]. Таким образом, поиск альтернативных средств для профилактики и лечения дисбактериозов является актуальной задачей.

При разработке препаратов на доклиническом этапе их эффективность и безопасность оценивается на лабораторных животных. Для оценки фармакологической эффективности препарата для восстановления нормальной микрофлоры кишечника целесообразно воспроизвести модель дисбактериоза кишечника у экспериментальных животных.

Согласно данным литературы, лабораторные крысы широко используются в качестве тест-систем для изучения состояния микробиоты кишечника [20–31]. Исходя из данных состава микрофлоры у человека и крыс, количество микроорганизмов у этого вида животных довольно близко к содержанию их у человека (табл. 1).

Таблица 1

Количество представителей облигатной и факультативной микрофлоры у крыс и человека [32]

Table 1

The number of representatives of obligate and facultative microflora in rats and humans [32]

Микроорганизм	Крыса	Человек
Облигатная микрофлора		
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10^7-10^9	10^9-10^{10}
<i>Lactobacillus</i> spp.	10^5-10^8	10^7-10^8
<i>Enterococcus</i> spp.	10^5-10^7	10^5-10^8
Факультативная микрофлора		
<i>Staphylococcus</i> spp.	10^2-10^5	10^2-10^4
<i>Candida</i> spp.	10^2-10^5	10^4

В доступных литературных источниках описаны экспериментальные модели антибиотик-индуцированного дисбактериоза кишечника у лабораторных животных [20–31, 33], которые отличаются между собой выбором антибактериального препарата в качестве индуктора патологии.

Предпосылкой для проведения данного исследования явилась работа в области лечения и профилактики дисбактериозов, защищённая патентом РФ №2593584 [15]. Было показано, что применение лактата кальция приводит к ускорению нормализации состава и количества микрофлоры кишечника при дисбактериозах [15].

Материал и методы / Materials and Methods

Животные / Animals

В исследовании использовали самцов крыс линии Wistar в возрасте 8–10 недель (4 группы по 10 животных; $n = 40$). Проведение эксперимента было одобрено биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Всех животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях¹ и Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных². Световой режим составлял 12 ч день и 12 ч темноты. Крысы получали полнорационный гранулированный комбикорм и питьевую воду *ad libitum*. Животных содержали в стандартных пластиковых клетках по 5 особей.

Дизайн эксперимента / Experiment design

По результатам пилотного исследования в качестве индуктора патологии был выбран антибактериальный препарат Амоксиклав® в форме порошка для приготовления суспензии. В ходе пилотного исследования при ежедневном (в течение 7 дней) внутривентральном введении готовой суспензии Амоксиклав® в дозе 75 мг/кг (по действующему веществу амоксициллин) регистрировали снижение количества основной кишечной микрофлоры (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacterium* spp.) в образцах кала у самцов крыс. Также на данной модели наблюдали развитие клинических симптомов дисбактериоза в виде размягчения кала и диареи, что соответствовало данным литературы [27]. Таким образом, в качестве индуктора патологии вводили готовую суспензию Амоксиклав® в дозе 75 мг/кг (по действующему веществу амоксициллин) ежедневно 1 раз в день в течение 7 дней всем экспериментальным животным.

Аналогично в течение 7 дней вводили тестируемый препарат на основе лактата кальция экспериментальным животным в дозах 5 мг/кг (0,20 высшей терапевтической дозы (ВТД) человека), 25 мг/кг (ВТД человека) и 125 мг/кг (5ВТД человека) ежедневно

¹ Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях / пер. с англ. Под ред. М.С. Красильщиковой, И.В. Белозерцевой. – СПб., 2012. 48 с. [Direktiva 2010/63/EU Yevropeyskogo Parlamenta i Soveta Yevropeyskogo Soyuzo po okhrane zhyvotnykh, ispol'zuyemykh v nauchnykh tselyakh / transl. from English. Ed. MS Krasilshchikova, IV Belozertseva. St. Petersburg, 2012. (In Russ.)]

² Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е издание / пер. с англ. Под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. – М.: ИРБИС, 2017. – 336 с. [Rukovodstvo po soderzhaniyu i ispol'sovaniyu laboratornykh zhyvotnykh. Vos'moe izdanie / transl. from English. Ed. IV Belozercevoi, DV Blinova, MS Krasil'shikovoi. Moscow: IRBIS, 2017. (In Russ.)]

1 раз в день через 2 часа после введения индуктора патологии внутривентриально. Животным контрольной группы вводили 1 % раствор крахмала по аналогии с введением тестируемого препарата.

Оценку динамики массы тела животных выполняли на 1-й, 8-й и 15-й дни исследования. Ежедневно в течение 15 дней проводили клиническое наблюдение животных с оценкой физических характеристик кала по балльной системе [34].

Балльная система характеризовала степень развития патологического процесса. Чем выше было балльное значение, тем более выражено протекал патологический процесс. Критерии оценки учитывали изменения консистенции и влажности стула следующим образом: 0 — нормальная консистенция и сухость стула; 1 — влажный стул; 2 — пастообразный стул; 3 — полужидкий стул; 4 — водянистая диарея.

Забор образцов кала проводили до введения индуктора патологии на 1-й, 4-й, 8-й, 11-й и 15-й дни исследования для последующего проведения микробиологического исследования.

Полученные пробы с образцами кала разводили стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:9, затем пробирки встряхивали до получения однородной суспензии. Из полученной суспензии делали 10-кратные разведения в изотоническом растворе натрия хлорида, максимально до 10^{-7} .

Для *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp., *Lactobacterium* spp. выполняли поверхностный посев на питательные среды с помощью шпателя Дригальского в объеме по 100 мкл бактериальной суспензии (табл. 2).

Для *Bifidobacterium* spp. применяли технику глубинного посева: в стерильную чашку Петри вносили 1 мл суспензии, после чего сверху заливали питательной средой в объеме 20 мл (см. табл. 2).

Посевы инкубировали в термостате при температуре +35–37 °C в течение 24 (*Enterococcus* spp., *Lactobacterium* spp.), 48 (*Staphylococcus* spp., *Candida* spp.) и 72 часов (*Bifidobacterium* spp.). Дополнительно чашки Петри с посевами для культивирования *Lactobacterium* spp. и *Bifidobacterium* spp. помещали в контейнер инкубационный (анаэробостат).

Каждый день чашки Петри с посевами просматривали визуально на наличие роста колоний микроорганизмов. Выросшие колонии идентифицировали с помощью микроскопии окрашенных мазков по Граму (рис. 2) и морфологических признаков колоний микроорганизмов в (рис. 3).

Таблица 2

Перечень микроорганизмов для анализа и информация об используемых в эксперименте питательных средах

Table 2

A list of microorganisms for analysis and information about the nutrient media used in the experiment

Микроорганизм	Питательные среды
<i>Enterococcus</i> spp.	Энтерококк агар (селективная среда для энтерококков) (ООО «НПЦ «Биокомпас-С», Россия)
<i>Staphylococcus</i> spp.	Baird-Parker agar («Merck», Германия) с добавлением желточно-туйритовой эмульсии (Egg yolk tellurite emulsion) («Merck», Германия)
<i>Candida</i> spp.	Агар Сабуро с хлорамфениколом (ООО «НИЦФ», Россия)
<i>Lactobacterium</i> spp.	MRS Agar («Sigma», США) и Tween80
<i>Bifidobacterium</i> spp.	TOS-propionate agar («Merck», Германия) + MUP Selective supplement («Merck», Германия); TOS-propionate agar («Sigma», США) + Lithium mupirocin supplement («Sigma», США)

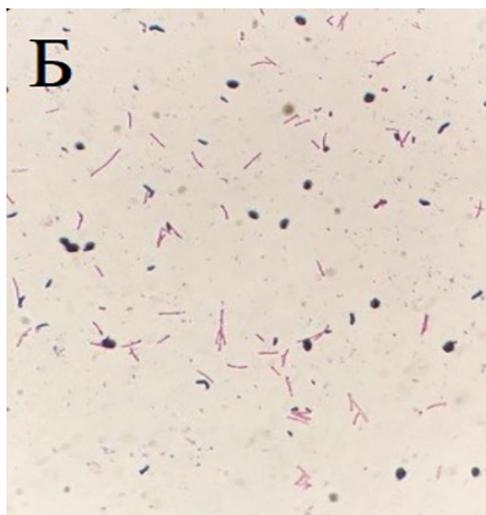
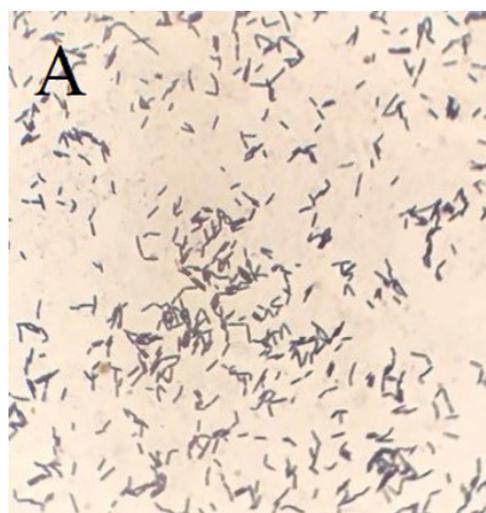


Рис. 2. Пример микроскопии окрашенных мазков по Граму:

А — *Lactobacterium* spp.; Б — *Bifidobacterium* spp.

Fig. 2. Example of microscopy of colored smears by Gram:

А — *Lactobacterium* spp.; Б — *Bifidobacterium* spp.

Количественное содержание микроорганизмов в 1 г кала определяли по формуле (1):

$$N = n \times 10 \times 10 \text{ (или } 100, \text{ или } 1000), \text{ (1)}$$

где N — количество микроорганизмов в 1 г кала; n — количество микроорганизмов, выросших на чашке; 10 — пересчёт на 1 г кала, 10, 100 или 1000 — разведение материала, засеянного на чашку, с которой ведут подсчёт колоний.

Статистический анализ / Statistical analysis

Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism, версия 9 («GraphPad», США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка и графиков квантиль-квантиль (QQ plot). Данные, имеющие нормальное распределение, представлены как $M \pm SEM$, где M — среднее арифметическое; SEM — стандартная ошибка среднего. В случае ненормального распределения результаты представлены в виде $Me (Q1; Q3)$, где Me — медиана; $Q1$; $Q3$ — межквартильный размах. В зависимости от типа

распределения данных применяли параметрические (*Tukey's test analysis*) и непараметрические методы (*Mann-Whitney's test analysis*). Все критерии были двусторонними. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Показатель массы тела является интегральным показателем общего состояния животных. У всех самцов крыс регистрировали равномерное увеличение массы тела на протяжении всего эксперимента.

При оценке физических характеристик кала, в группе негативного контроля первые клинические признаки развития дисбактериоза в виде влажных и пастообразных фекалий отмечали на 2-й день введения индуктора патологии. Пик развития дисбактериоза регистрировали на 4-й день эксперимента. Выраженная картина проявления дисбиоза сохранялась до отмены введения индуктора патологии. После отмены введения препарата Амоксиклав® наблюдали посте-

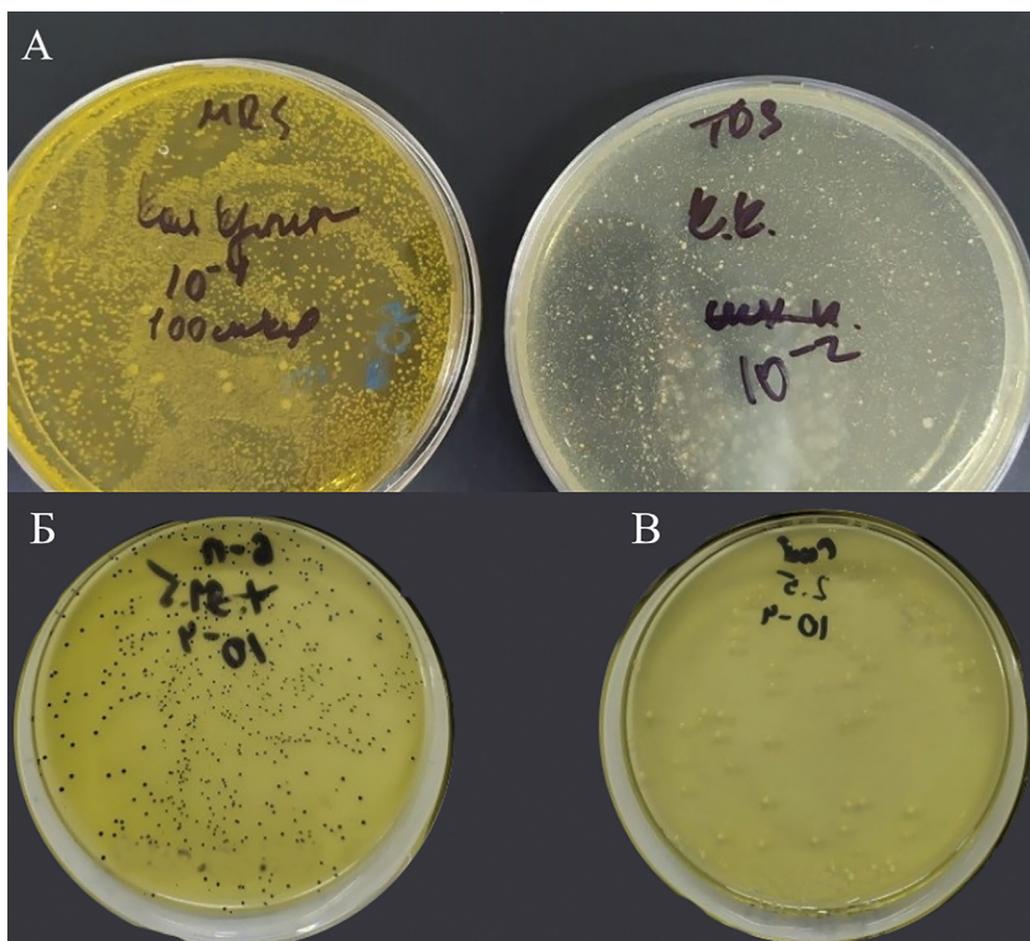


Рис. 3. Пример роста колоний на питательных средах:

A — слева *Lactobacterium* spp. и справа *Bifidobacterium* spp.; Б — *Staphylococcus* spp.; В — *Candida* spp.

Fig. 3. Example of colony growth on nutrient media:

A — left *Lactobacterium* spp. and on the right *Bifidobacterium* spp.; Б — *Staphylococcus* spp.; В — *Candida* spp.

пенную нормализацию физических характеристик, что свидетельствовало о саморазрешении антибиотик-индуцированного дисбактериоза (рис. 4). Аналогично в ходе исследования Ермоленко Е.И. и соавт. [27] на фоне введения антимикробных препаратов и на ранних сроках после их отмены у животных с индукцией патологии, не получавших лечение, наблюдали признаки диспепсии: маслянистая консистенция фекалий, в некоторых случаях понос или полифекалия.

Применение кальция лактата в минимально исследуемой дозе 5 мг/кг не оказало терапевтического влияния на развитие патологии у крыс (рис. 4). В группах животных, получавших в качестве лечения кальция лактат в дозах 25 мг/кг и 125 мг/кг, соответственно, отмечали достоверное снижение выраженности патологического процесса по сравнению с группой негативного контроля. У крыс, получавших тестируемый препарат в максимальной дозе, отмечали минимальные изменения физических характеристик кала. С 11-го дня эксперимента наблюдали полное восстановление стула у всех животных данной группы (см. рис. 4). В соответствии с полученными данными применение кальция лактат в дозах 25 мг/кг и 125 мг/кг способствовало нормализации стула у животных с 10-го и 11-го дня эксперимента, соответственно.

В результате анализа данных количественного определения представителей кишечной микрофлоры животных установлено, что до начала введения индуктора патологии (1-й день эксперимента) состав кишечной микрофлоры не отличался у самцов крыс

всех экспериментальных групп (см. рис. 4). Полученный в исследовании качественный и количественный состав микробиоты кишечника крыс не расходился с данными литературы [32, 35–37]. Так, микрофлора кишечника здоровых крыс была представлена преимущественно облигатной флорой (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacterium* spp. и *Enterococcus* spp.) и в меньшей степени содержала факультативные микроорганизмы (*Staphylococcus* spp. и *Candida* spp.).

По мере развития антибиотик-индуцированного дисбактериоза у крыс группы негативного контроля отмечали существенные изменения состава кишечной микрофлоры. На протяжении всего эксперимента регистрировали статистически значимое снижение количества *Lactobacterium* spp. относительного исходного уровня (рис. 5, а). Отмечали отсутствие роста на питательных средах *Bifidobacterium* spp. и *Enterococcus* spp. на 4-й и 8-й (период индукции патологии), а также 11-й дни эксперимента (период отмены введения индуктора патологии) (рис. 5, б, в). По окончании эксперимента (15-й день) данные микроорганизмы были обнаружены в небольших количествах по сравнению с их исходным содержанием в образцах кала. По мере развития патологии отмечали статистически значимое увеличение количества факультативной (условно-патогенной) микрофлоры (*Staphylococcus* spp., *Candida* spp.) по сравнению с 1-м днем эксперимента (рис. 5, г, д). Также отмечали обильный рост плесени. Подобный результат наблюдали в работе Wu H с соавт., где был воспроизведен антибиотик-

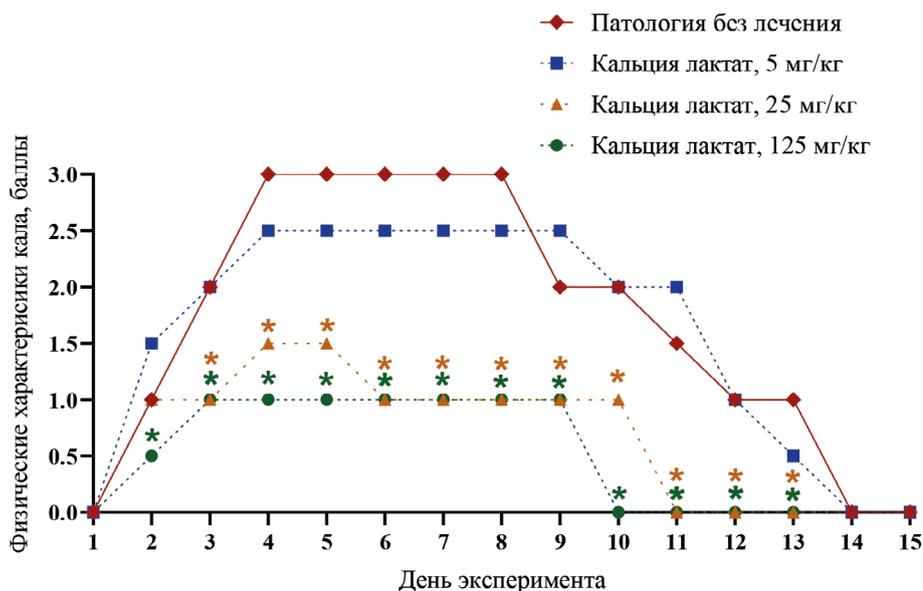


Рис. 4. Изменения физических характеристик кала на протяжении эксперимента, баллы, Me, $n = 10$

Fig. 4. Changes in the physical characteristics of feces during the experiment, points, Me, $n = 10$

Примечание: * — критерий Манна–Уитни, различия с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,05$
 Note: * is the Mann–Whitney criterion, differences with the control group are statistically significant, $p < 0.05$

индуцированный дисбактериоз на крысах [38]. Во время индукции патологии, начиная с 4-го дня эксперимента, микробиота животных изменилась в сторону увеличения факультативной микрофлоры и уменьшения облигатной, с последующим восстановлением после прекращения приёма антибиотиков. Однако первоначальный количественный состав микробиоты возобновлён не был. Такую же динамику в отношении количественного состава микрофлоры наблюдали в аналогичном моделировании патологии на крысах в модели *Tarasova E u соавт.* [39]

Применение в качестве лечения кальция лактата в дозе 5 мг/кг не предотвратило изменение состава кишечной микрофлоры по мере развития патологии в сравнении с исходным уровнем, что свидетельствует об отсутствии терапевтического эффекта тестируемого препарата в данной дозе. Как и в группе негативного контроля был обнаружен обильный рост плесени. Выраженные терапевтические эффекты отмечены при применении кальция лактата в дозах 25 и 125 мг/кг. Отмечали статистически значимое снижение КОЕ/г кала представителей условно-патогенной микрофлоры и увеличение количества микроорганизмов облигатной флоры по сравнению с группой негативного контроля в ходе всего эксперимента (см. рис. 5). В период введения индуктора патологии наблюдали незначительное снижение КОЕ/г кала *Lactobacterium* spp. и *Bifidobacterium* spp. по сравнению с исходным содержанием микроорганизмов в образцах фекалий (см. рис. 5, а, б). Стоит отметить, что в данных группах на протяжении всего эксперимента отмечали рост на питательных средах *Bifidobacterium* spp. и *Enterococcus* spp. По окончании эксперимента регистрировали полную нормализацию количества облигатной микрофлоры в образцах кала. Несмотря на повышение в образцах количества *Candida* spp. в данных экспериментальных группах не наблюдали роста плесени (рис. 5, д).

Заключение / Conclusion

В исследовании была успешно сформирована модель антибиотик-индуцированного дисбактериоза у самцов крыс путём многократного внутрижелудочного введения антибактериального препарата Амоксиклав® в дозе 75 мг/кг, что подтвердилось выраженными изменениями физических характеристик кала и существенным изменением состава кишечной микрофлоры в пользу увеличения количества условно-патогенных микроорганизмов на фоне снижения представителей облигатной флоры.

Исходя из полученных данных, применение тестируемого препарата кальция лактата в дозах 25 и 125 мг/кг оказало значимые терапевтические эффекты в виде снижения выраженности патологического процесса и сокращения периода восстановления физических характеристик кала и привело к полной нормализации состава кишечной микрофлоры через неделю после

отмены антибактериального препарата. При этом существенной разницы при повышении дозы с 25 мг/кг до 125 мг/кг не отмечено. Кроме того доза 25 мг/кг (ВТД) более выражено снижала количество условно-патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus* spp., *Candida* spp.) по сравнению с дозой 125 мг/кг (5ВТД).

Лактат кальция является солью молочной кислоты, которая, попадая в желудочно-кишечный тракт, диссоциирует на ионы кальция и лактат [3]. Было доказано, что антагонистическая активность молочнокислых бактерий в отношении патогенных и условно-патогенных микробов обусловлена конкуренцией за рецепторы на эпителии слизистой оболочки кишечника. Продукция молочной кислоты данными бактериями оказывает угнетающее действие на патогены [40]. Таким образом, вероятно, лактат кальция и обеспечивает терапевтический эффект в виде поддержания количества облигатной микрофлоры в необходимых пределах и уменьшает период восстановления кишечной микрофлоры, что установлено в проведённом исследовании.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ЭЮЦ Клиник».

Acknowledgements. The work was supported by LLC «EUC Clinic».

Участие авторов. *Полюга Н. Л.* — концепция и дизайн, сбор и систематизация материала, написание текста статьи; *Трофимец Е. И.* — сбор и систематизация материала, работа с источниками литературы, статистическая обработка данных; *Боровкова К. Е., Никифорова Л. Р., Салмова Ю. В.* — проведение микробиологического исследования образцов кала. *Пелешок А. А.* — доработка текста рукописи; *Крышень К. Л.* — анализ научной и методической литературы, редактирование текста рукописи; *Макарова М. Н.* — критический пересмотр содержания, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; *Колодкин А. М., Митерева Д. Е., Касаткина И. С.* — сбор и анализ данных, рецензирование рукописи.

Participation of authors. *Polyuga NL* — concept and design, data collection and systematization, writing the manuscript; *Trofimets EI* — data collection and systematization, work with literary sources, statistical data processing; *Borovkova KE, Nikiforova LR, Salmova JV* — conducting microbiological examination of stool samples; *Peleshok AA* — editing and revision of the text of the manuscript; *Kryshen KL* — analysis of scientific and methodological literature, editing of the text of the manuscript; *Makarova MN* — critical revision of the content, approved the final version of the manuscript; *Kolodkin AM, Mitereva DE, Kasatkina IS* — data collection and analysis, manuscript review.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Полюга Наталия Любомировна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: polyuga.nl@doclinika.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8569-0535>
н. с. отдела специфической токсикологии
и микробиологии АО «НПО «ДОМ
ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл.,
Российская Федерация

Трофимец Екатерина Игоревна
e-mail: trofimets.ekat@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3246-6457>
заместитель руководителя отдела
специфической токсикологии и
микробиологии АО «НПО «ДОМ
ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл.,
Российская Федерация

Боровкова Кристина Евгеньевна
e-mail: borovkova.ke@doclinika.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1571-6549>
Руководитель лаборатории микробиологии АО
«НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская
обл., Российская Федерация

Никифорова Лия Ринатовна
e-mail: nikiforova.lr@doclinika.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8710-2023>
заместитель руководителя лаборатории
микробиологии АО «НПО «ДОМ
ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл.,
Российская Федерация

Салмова Юлия Владимировна
e-mail: salmova.uv@doclinika.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9891-8634>
н. с. лаборатории микробиологии АО «НПО
«ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл.,
Российская Федерация

Пелешок Андрей Андреевич
e-mail: peleshok.aa@doclinika.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9980-2684>
стажёр-исследователь лаборатории клеточной
биологии и цитогенетики АО «НПО
«ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл.,
Российская Федерация

Nataliia L. Polyuga
Corresponding author
e-mail: polyuga.nl@doclinika.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8569-0535>
Research fellow, department of specific toxicology
and microbiology, Research and manufacturing
company “Home of Pharmacy”, Leningrad region,
Russian Federation

Ekaterina I. Trofimets
e-mail: trofimets.ekat@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3246-6457>
Deputy head of the department of specific toxicol-
ogy and microbiology Research and manufacturing
company “Home of Pharmacy”, Leningrad region,
Russian Federation

Kristina E. Borovkova
e-mail: borovkova.ke@doclinika.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1571-6549>
Head of microbiological laboratory Research and
manufacturing company “Home of Pharmacy”,
Leningrad region, Russian Federation

Lia R. Nikiforova
e-mail: nikiforova.lr@doclinika.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8710-2023>
Deputy head of microbiological laboratory Research
and manufacturing company “Home of Pharmacy”,
Leningrad region, Russian Federation

Julia V. Salmova
e-mail: salmova.uv@doclinika.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9891-8634>
Researcher microbiological laboratory Research
and manufacturing company “Home of Pharmacy”,
Leningrad region, Russian Federation

Andrey A. Peleshok
e-mail: peleshok.aa@doclinika.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9980-2684>
Intern researcher, Laboratory of cell biology and
cytogenetics Research and manufacturing company
“Home of Pharmacy”, Leningrad region, Russian
Federation

Крышень Кирилл Леонидович

e-mail: kryshen.kl@doclinika.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
 к. б. н., руководитель отдела специфической токсикологии и микробиологии, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Российская Федерация

Макарова Марина Николаевна

e-mail: makarova.mn@doclinika.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
 д. м. н., директор АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Российская Федерация

Колодкин Алексей Михайлович

e-mail: kolodkin.a@pharm-company.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-2017>
 исследователь Научное общество «Микробиота», Московская обл., Сергиево-Посадский район, Российская Федерация

Митерева Дарья Евгеньевна

e-mail: d.mitereva@expert-lc.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0002-8413-4278>
 к. м. н., специалист по клиническим и доклиническим исследованиям ООО «ЭЮЦ Клиник», Москва, Российская Федерация

Касаткина Ирина Сергеевна

e-mail: kasatkina-maikop@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6177-3360>
 к. м. н., генеральный директор ООО «ЭЮЦ Клиник», Москва, Российская Федерация

Kirill L. Kryshen

e-mail: kryshen.kl@doclinika.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
 PhD, Cand. Sci. (Biology), Head of the department of specific toxicology and microbiology, Research and manufacturing company “Home of Pharmacy”, Leningrad region, Russian Federation

Marina N. Makarova

e-mail: makarova.mn@doclinika.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
 Dr. Sci (Med.), Director Research and manufacturing company “Home of Pharmacy”, Leningrad region, Russian Federation

Alexei M. Kolodkin

e-mail: kolodkin.a@pharm-company.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-2017>
 Researcher Scientific Society “Microbiota”, Moscow region, Sergiev Posad district, Russian Federation

Daria E. Mitereva

e-mail: d.mitereva@expert-lc.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0002-8413-4278>
 PhD, Cand. Sci. (Med.), specialist in clinical and preclinical research “EUC Clinic” LLC, Moscow, Russian Federation

Irina S. Kasatkina

e-mail: kasatkina-maikop@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6177-3360>
 PhD, Cand. Sci. (Med.), General Director “EUC Clinic” LLC, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Chen Y, Zhou J, Wang L. Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:625913. DOI: 10.3389/fcimb.2021.625913.
2. Евдокимова А.Г., Жуколенко Л.В., Иванова Т.Б., Стрюк Р.И. Коррекция микрофлоры кишечника синбиотиком Максилак. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2019;166(6):62–69. [Evdokimova AG, Zhukolenko LV, Ivanova TB, Stryuk RI. Correction of intestinal microflora synbiotic Maxilac. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2019;166(6): 62–69. (In Russ.)]. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-166-6-62-69.
3. Микробиота / под ред. Е.Л. Никонова, Е.Н. Поповой. М.: Издательство Медиа Сфера; 2007. [Mikrobiota / Ed by Nikonova EL, Popovoi EN. Moscow: Izdatel'stvo Media Sfera; 2007. (In Russ.)].
4. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 2017;474(11):1823–1836. DOI: 10.1042/BCJ20160510.
5. Отраслевой стандарт ОСТ 91500.11.0004–2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (утв. Приказом Минздрава России от 09.06.2003 № 231). [Industry standard OST 91500.11.0004–2003 «Protokol vedeniya bol'nykh. Disbakterioz kishhechnika» (utv. Prikazom

Minzdrava Rossii ot 09.06.2003 № 231) (In Russ.)]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200119089>. Ссылка активна на 21.06.2023.

6. Бондаренко В.М., Лиходел В.Г. Методические рекомендации «Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника». ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН Москва. 2007;74 [Bondarenko VM, Likhoded VG. Metodicheskie rekomendatsii «Mikrobiologicheskaya diagnostika disbakterioza kishhechnika». GU NIEM im. N.F. Gamalei RAMN Moskva. 2007;74 (In Russ.)].
7. Weiss GA, Hennet T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(16):2959–2977. DOI: 10.1007/s00018-017-2509-x.
8. Косенко И.М. Нарушения микробиоценоза кишечника и их коррекция. *Педиатрия.* 2009;(3):25–28. [Kosenko IM. Narusheniya mikrobiotsenoza kishhechnika i ikh korrektsiya. *Pediatriya.* 2009;(3):25–28. (In Russ.)].
9. Бельмер С.В., Шиголева Н.Е., Хавкин А.И. и др. Пробиотическая коррекция антибиотик-ассоциированного дисбактериоза кишечника у детей. *Вопросы современной педиатрии.* 2007;6(3):89–93. [Bel'mer SV, Shchigoleva NYe, Khavkin AI, et al. Probiotic correction of antibiotic-associated intestinal dysbacteriosis in children. *Current Pediatrics.* 2007;6(3):89–93 (In Russ.)].

10. Ерюхин И.А., Шляпников С.А., Лебедев В.Ф., Иванов Г.А. Псевдомембранозный колит и «кишечный сепсис» — следствие дисбактериоза, вызванного антибиотиками. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 1997;156(2):108–111. [Eryukhin IA, Shliapnikov SA, Lebedev VF, Ivanov GA. Pseudomembranous colitis i «kischechnyi sepsis» — sledstvie disbakterioza, vyzvannogo antibiotikami. *Vestnik khir im II Grekova*. 1997;156(2):108–111. (In Russ.)].
11. Wiperman MF, Fitzgerald DW, Juste MAJ, et al. Antibiotic treatment for Tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome that persists long after therapy is completed. *Sci Rep*. 2017;7(1):10767. DOI: 10.1038/s41598-017-10346-6.
12. Neuman H, Forsythe P, Uzan A et al. Antibiotics in early life: dysbiosis and the damage done. *FEMS Microbiol Rev*. 2018;42(4):489–499. DOI: 10.1093/femsre/fuy018.
13. Le Bastard Q, Al-Ghalith GA, Grégoire M, et al. Systematic review: human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(3):332–345. DOI: 10.1111/apt.14451.
14. Quigley EMM. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(2):333–344. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.09.028.
15. Патент РФ на изобретение №2593584/ 10.08.2016 Бюл. №22. Чичерин И.Ю. Средство для восстановления кишечного микробиоценоза при дисбиозах. [Patent RUS №2593584/ 10.08.2016 Byul. №22. Chicherin IYu. Sredstvo dlya vosstanovleniya kischechnogo mikrobiotsenoza pri disbiozakh. (In Russ.)]. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/97/ba/32/ff636317bf19ac/RU2593584C1.pdf>. Ссылка активна на 21.06.2023.
16. Марданова А.М., Кабанов Д.А., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие. Центр печати «Линк», 2016. [Mardanova AM, Kabanov DA, Rudakova NL, Sharipova MR. Bioplenki: osnovnye metody issledovaniya: uchebno-metodicheskoe posobie. Tsentr pechati «Link», 2016 (In Russ.)].
17. Токарева Н.А. Коррекция и профилактика дисбактериоза. Новые подходы к терапии заболеваний желудочно-кишечной системы. Кишечная микрофлора. *Сборник научных статей*. 2012;(1):56–60. [Tokareva NA. Korrrektsiya i profilaktika disbakterioza. Novye podkhody k terapii zabolevaniy zheludочно-kishechnoy sistemy. Kischechnaya mikroflora. *Sbornik nauchnykh statei*. 2012;(1):56–60. (In Russ.)].
18. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека. *Экспериментальная гастроэнтерология*. 2011;(3):6–11. [Darmov IV, Chicherin IYu, Pogorelskii IP, Lundovskikh IA. Vyzhivaemost' mikroorganizmov probiotikov v usloviyakh *in vitro*, imitiruyushchikh protsess pishchevareniya u cheloveka. *Experimental gastroenterology*. 2011;(3):6–11. (In Russ.)].
19. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Ердякова А.С. и др. Сравнительная оценка выживаемости микроорганизмов пробиотиков в составе коммерческих препаратов в условиях *in vitro*. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2011;(9):96–101. [Darmov IV, Chicherin IYu, Erdyakova AS, et al. Comparative assessment of survival of probiotic microorganisms from commercial preparations under the conditions *in vitro*. *Experimental & clinical gastroenterology*. 2011;(9):96–101. (In Russ.)].
20. Wu H, Ma Y, Peng X et al. Antibiotic-induced dysbiosis of the rat oral and gut microbiota and resistance to Salmonella. *Arch Oral Biol*. 2020;114:104730. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2020.104730.
21. Wang T, Hu X, Liang S, et al. Lactobacillus fermentum NS9 restores the antibiotic induced physiological and psychological abnormalities in rats. *Benef Microbes*. 2015;6(5):707–717. DOI: 10.3920/BM2014.0177.
22. Burovenko IY, Borshchev YY, Minasian SM, et al. Effect of Combined Antimicrobial Therapy on Ischemia/Reperfusion Myocardial Injury in Rats with Acute Inflammation of the Large Intestine against the Background of Alimentary Obesity. *Bull Exp Biol Med*. 2020;168(3):309–312. DOI:10.1007/s10517-020-04697-w
23. Graversen KB, Locke AV, Bahl MI, et al. The effect of amoxicillin-induced intestinal dysbiosis and cholera toxin on gut health and allergic sensitization to cow's milk—a study in Brown Norway rats. In 10th EAACI Pediatric Allergy and Asthma Meeting 2019.
24. Silva EN, Martins TVF, Miyauchi-Tavares TM, et al. Amoxicillin-induced gut dysbiosis influences estrous cycle in mice and cytokine expression in the ovary and the caecum. *Am J Reprod Immunol*. 2020;84(1):e13247. DOI: 10.1111/aji.13247.
25. Dudek-Wicher RK, Junka A, Bartoszewicz M. The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Prz Gastroenterol*. 2018;13(2):85–92. DOI: 10.5114/pg.2018.76005.
26. Zoppi G, Cinquetti M, Benini A, et al. Modulation of the intestinal ecosystem by probiotics and lactulose in children during treatment with ceftriaxone. *Current therapeutic research*. 2001;62(5):418–435. doi: 10.1016/S0011-393X(01)89006-8.
27. Ермоленко Е.И., Донец В.Н., Дмитриева Ю.В. и др. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина*. 2009;(1):157–167. [Yermolenko EI, Donetsk VN, Dmitrieva YuV et al. Influence of probiotic enterococci on functional characteristics of rat bowel under dysbiosis induced by antibiotics. *Vestnik SPbSU*. 2009;(1):157–167. (In Russ.)].
28. Morel FB, Oozeer R, Piloquet H, et al. Prewaning modulation of intestinal microbiota by oligosaccharides or amoxicillin can contribute to programming of adult microbiota in rats. *Nutrition*. 2015;31(3):515–522. DOI: 10.1016/j.nut.2014.09.011.
29. Hu X, Wang T, Liang S, et al. Antibiotic-induced imbalances in gut microbiota aggravates cholesterol accumulation and liver injuries in rats fed a high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(21):9111–9122. DOI: 10.1007/s00253-015-6753-4.
30. Manichanh C, Reeder J, Gibert P, et al. Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Res*. 2010;20(10):1411–1419. DOI: 10.1101/gr.107987.110.
31. Peuranen S, Tiihonen K, Apajalahti J, et al. Combination of polydextrose and lactitol affects microbial ecosystem and immune responses in rat gastrointestinal tract. *Br J Nutr*. 2004;91(6):905–914. DOI: 10.1079/BJN20041114.
32. Макарова М.Н., Крышень К.Л., Алякринская А.А. и др. Характеристика микрофлоры кишечника у человека и лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2016;(4):86–94. [Makarova MN, Kryshen KL, Alyakrinskaya AA, et al. Characteristics of the intestinal microflora in humans and laboratory animals. *International bulletin of Veterinary Medicine*. 2016;(4):86–94. (In Russ.)].
33. Rosa CP, Brancaglion GA, Miyauchi-Tavares TM, et al. Antibiotic-induced dysbiosis effects on the murine gastrointestinal tract and their systemic repercussions. *Life Sci*. 2018;207:480–491. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.06.030.
34. de Queiroz CA, Fonseca SG, Frota PB, et al. Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:136. Published 2014 Aug 5. DOI: 10.1186/1471-230X-14-136.
35. Hor YY, Lew LC, Jaafar MH, et al. Lactobacillus sp. improved microbiota and metabolite profiles of aging rats. *Pharmacol Res*. 2019;146:104312. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104312.
36. Jena PK, Trivedi D, Thakore K, et al. Isolation and characterization of probiotic properties of Lactobacilli isolated from rat fecal microbiota. *Microbiol Immunol*. 2013;57(6):407–416. DOI: 10.1111/1348-0421.12054.
37. Ким А.Д., Гольдберг О.А., Лепехова С.А. и др. Особенности топографической анатомии и пристеночной микрофлоры дистального отдела толстой кишки у крыс линии Wistar. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016;1(2(108)):48–54. [Kim AD, Goldberg OA, Lepekova SA, et al. Peculiarities of topographic anatomy and crypt compartment of distal colon in wistar rats. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016;1(2(108)):48–54. (In Russ.)]. DOI: 10.12737/20615.
38. Wu H, Ma Y, Peng X, et al. Antibiotic-induced dysbiosis of the rat oral and gut microbiota and resistance to Salmonella. *Arch Oral Biol*. 2020;114:104730. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2020.104730.
39. Tarasova E, Yermolenko E, Donetsk V, et al. The influence of probiotic Enterococcus faecium strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics. *Benef Microbes*. 2010;1(3):265–270. DOI: 10.3920/BM2010.0008.
40. Жакслыкова С.А., Хабибуллин Р.Э., Яковлева Г.Ю., Решетник О.А. Антагонистическая активность бактериальных молочнокислых заквасок. *Вестник Казанского технологического университета*. 2014;17(10):152–155. [Zhakslykova SA, Khabibullin RE, Yakovleva GYu, Reshetnik OA. Antagonisticheskaya aktivnost' bakterial'nykh molochnokislykh zakvasok. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2014;17(10):152–155. (In Russ.)].

Нейропептид цикло-L-пролилглицин противодействует скополамин-индуцированному нарушению долговременной памяти у крыс в тесте «Распознавание нового объекта»

© Воронцова О. Н., Аляева А. Г., Колясникова К. Н., Вальдман Е. А., Поварнина П. Ю.

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

Аннотация. Актуальность. Цикло-L-пролилглицин (ЦПГ) сконструирован и синтезирован в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова как топологический аналог классического ноотропа пирacetama и в дальнейшем идентифицирован как эндогенное соединение. Ранее ноотропный эффект ЦПГ был выявлен на модели ретроградной амнезии у крыс, вызванной электрошоком, в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). **Цель.** Цель настоящего исследования — изучить ноотропный эффект ЦПГ в более физиологичных условиях в отсутствие сильных стрессорных факторов. **Методы.** Амнезию у крыс моделировали внутрибрюшинным (в/б) введением скополамина в дозе 2 мг/кг. ЦПГ вводили в/б в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг через 15 мин после скополамина. Кратковременную и долговременную память регистрировали в тесте распознавания нового объекта. **Результаты.** Установлено, что введение скополамина нарушало только долговременную память крыс. ЦПГ в дозе 0,1 мг/кг практически полностью противодействовал этому нарушению. Сам ЦПГ не влиял на память крыс в обеих изученных дозах. **Заключение.** Таким образом, ЦПГ проявляет ноотропную активность не только в авersive условиях теста УРПИ и электрошоковой амнезии, но и в нейтральной ситуации в тесте распознавания нового объекта, когда амнезия была вызвана введением скополамина.

Ключевые слова: циклопролилглицин; ноотропная активность; скополаминная амнезия; тест распознавания нового объекта

Для цитирования:

Воронцова О. Н., Аляева А. Г., Колясникова К. Н., Вальдман Е. А., Поварнина П. Ю. Нейропептид цикло-L-пролилглицин противодействует скополамин-индуцированному нарушению долговременной памяти у крыс в тесте «Распознавание нового объекта». *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):50–55. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-50-55>

Поступила: 03.05.2023. В доработанном виде: 13.05.2023. Принята к печати: 02.06.2023. Опубликовано: 30.09.2023.

Neuropeptide cyclo-L-prolylglycine counteracts scopolamine-induced long-term memory impairment in rats in the novel object recognition test

© Olga N. Vorontsova, Anna G. Alyaeva, Ksenia N. Koliashnikova, Elena A. Valdman, Polina Yu. Povarninav
FSBI "Research Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. Background. Cyclo-L-prolylglycine (CPG) was designed and synthesized at the V.V. Zakusov as a topological analogue of the classical nootropic piracetam and was further identified as an endogenous compound. Previously, the nootropic effect of CPG was revealed in a model of retrograde amnesia in rats induced by electroconvulsive shock in the passive avoidance test (PAT). **Objective.** The aim of the present study was to investigate the nootropic effect of CPG under more physiological conditions in the absence of strong stressors. **Methods.** Amnesia in rats was modeled by intraperitoneal (ip) administration of scopolamine at a dose of 2 mg/kg. CPG was administered ip at doses of 0.1 and 1.0 mg/kg 15 minutes after scopolamine. Short- and long-term memory were recorded in the novel object recognition test. **Results.** It was found that scopolamine disrupted only the long-term memory of rats. CPG at a dose of 0.1 mg/kg almost completely counteracted this impairment. CPG by itself had no effect on memory at both doses studied. **Conclusion.** Thus, CPG exhibits nootropic activity not only in the aversive conditions of the PAT and electroconvulsive shock-induced amnesia, but also in the neutral situation in the novel object recognition test, when the amnesia was caused by the administration of scopolamine.

Keywords: cycloprolylglycine; nootropic activity; scopolamine amnesia; novel object recognition test

For citations:

Vorontsova ON, Alyaeva AG, Koliashnikova KN, Valdman EA, Povarnina PYu. Neuropeptide cyclo-L-prolylglycine counteracts scopolamine-induced long-term memory impairment in rats in the novel object recognition test. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):50–55. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-50-55>

Received: 03.05.2023. Revision received: 13.05.2023. Accepted: 02.06.2023. Published: 30.09.2023.

Введение / Introduction

Цикло-L-пролилглицин (ЦПГ) был сконструирован и синтезирован как дипептидный топологический аналог классического ноотропа пирacetama (N-карбамидометилпирролидона-2) на основании оригинальной гипотезы о пептидергическом механизме действия этого препарата [1], а в дальнейшем идентифицирован как эндогенное соединение в головном мозге грызунов [2], в плазме крови, цереброспинальной жидкости и головном мозге человека [3].

Было показано, что ЦПГ проявляет характерные для пирacetama ноотропную [2, 4], анксиолитическую

[5], нейропротекторную [6], антигипоксическую [7] активности в интервале доз 0,1–1,0 мг/кг при внутрибрюшинном (в/б) введении.

Ноотропный эффект у ЦПГ был выявлен в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг, в/б на модели ретроградной амнезии у крыс, вызванной электрошоком, в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [2, 4].

Цель настоящего исследования — изучить ноотропный эффект ЦПГ в более физиологичных условиях в отсутствие сильных стрессорных факторов. Для регистрации памяти мы использовали тест распознавания нового объекта, основанный на естественном стремлении грызунов исследовать новые объекты. Амнезию моде-

лировали в/б введением антагониста ацетилхолиновых мускариновых рецепторов скополамина. Изучение возможных мнемотропных эффектов ЦПГ в новых условиях поможет получить новые фундаментальные знания об эндогенных механизмах регуляции памяти.

Таблица 1

Экспериментальные группы

Table 1

Experimental groups

Экспериментальные группы	<i>n</i>
Контроль	10
ЦПГ (1 мг/кг), в/б	10
ЦПГ (0,1 мг/кг), в/б	10
СКП (2 мг/кг), в/б	10
СКП (2 мг/кг), в/б + ЦПГ (1 мг/кг), в/б	10
СКП (2 мг/кг), в/б + ЦПГ (0,1 мг/кг), в/б	10

Примечания: СКП — скополамин; *n* — число животных в группе.

Notes: СКП — scopolamine; *n* is the number of animals in the group.

Материалы и методы / Materials and methods

Вещества / Substances. Циклический дипептид цикло-L-пролилглицин (т.пл. 204–207 °С, $[\alpha]_D^{20} -202^\circ$ (с 1, вода), ПМР спектр (ДМСО- d_6 + CF₃COOD), δ , м.д.: 1,8–2,2 (4H, м, C ^{α} H₂(Pro), C ^{β} H₂(Pro)), 3,37 (2H, м, C ^{δ} H₂(Pro)), 3,54 и 4,0 (2H, 2 д, C ^{α} H₂(Gly)), 4,11 (1H, д.д., C ^{α} H(Pro)), 8,09 (1H, уш с, NH)) был синтезирован в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Алкалоид скополамин (Scopolamine hydrobromide trihydrate) был получен из Acros Organics BVBA (Бельгия).

Животные / Animals. Эксперименты были проведены на 60 белых крысах-самцах линии Wistar массой 250–300 г, полученных из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, филиал «Столбовая». Животных содержали в клетках стандарта Т4 по 4 особи в каждой при свободном доступе к пище и воде. Чистку клеток проводили 2 раза в неделю, совмещая с хэндлингом. Взвешивание и метку животных проводили за 48 часов до эксперимента. Эксперименты с животными проводили в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», межгосударственными стандартами серии «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 (Приложение А к Европейской конвенции о защите Позвоночных

животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123)). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (протокол No 5 от 19 апреля 2022 г.). Поведенческое тестирование проводили в интервале 10:00–15:00.

Дизайн исследования / Research design. Животных распределяли по 6 экспериментальным группам случайным образом, используя в качестве критерия массу тела. В табл. 1 приведены экспериментальные группы с соответствующим им числом животных.

В эксперименте использовали ЦПГ в дозах 0,1 и 1 мг/кг, согласно [2], и алкалоид скополамин (Scopolamine hydrobromide trihydrate, Acros Organics) в дозе 2 мг/кг (доза выбрана на основании предварительного исследования). Оба соединения вводили крысам в/б в 2 мл дистиллированной воды на 1 кг массы тела. Введение веществ осуществляли по следующей схеме: скополамин вводили за 15 мин до введения ЦПГ, а через 15 мин после введения ЦПГ начина-

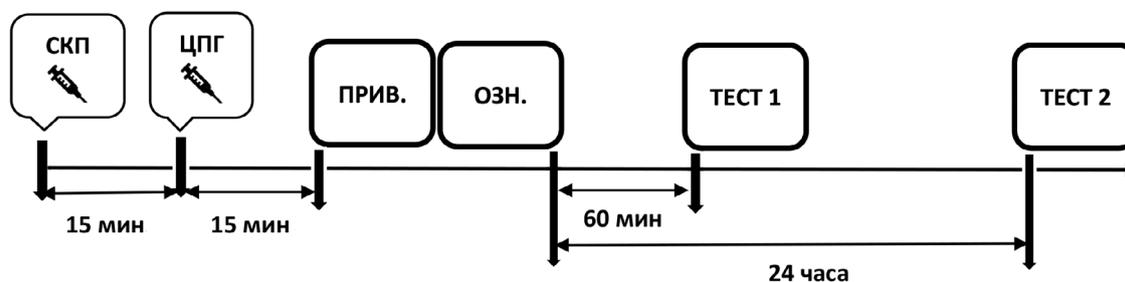


Рис. 1. Схема эксперимента

Fig. 1. Scheme of the experiment

Примечания: СКП — инъекция скополамина; ЦПГ — инъекция циклопролилглицина; ПРИВ. — этап привыкания к условиям тестирования (4 мин); ОЗН. — этап ознакомления с двумя одинаковыми объектами (4 мин); ТЕСТ 1 — этап предъявления знакомого и незнакомого объекта (4 мин); ТЕСТ 2 — этап предъявления знакомого и незнакомого объекта (4 мин).

Notes: СКП — injection of Scopolamine; ЦПГ (CPG) — injection of Cyclopropylglycine; ПРИВ. — the stage of getting used to the testing conditions (4 min); ОЗН. — the stage of familiarization with two identical objects (4 min); ТЕСТ 1 — the stage of presenting a familiar and unfamiliar object (4 min); ТЕСТ 2 — the stage of presenting a familiar and unfamiliar object (4 min).

ли тест «Распознавание нового объекта». Интервал 30 минут от введения скополамина до начала теста был выбран согласно исследованиям [8, 9]. Все животные получили равное количество инъекций: животные групп без скополамина или ЦПГ получили инъекцию дистиллированной воды (2 мл на 1 кг массы тела) в соответствующее время. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

Тест «Распознавание нового объекта» / Test "Recognition of a new object" [10] проводили как описано [11], в клетках Т4, идентичных домашним клеткам, при освещении на уровне клетки 35 люкс.

Для теста использовали контрастные тяжёлые объекты (О). О1 — герметичная чёрная жестяная ёмкость (высота 12 см, диаметр 6,5 см); О2 — стеклянная бутылочка сложной формы с оранжевой жидкостью и красочной этикеткой (высота 16,5 см, диаметр 6 см в нижней части); О3 — полипропиленовая прозрачная ёмкость с водой и синей этикеткой (высота 18 см, основание 5×6 см). Животные не имели возможности залезать на объекты, а лишь опирались на них передними лапами при обследовании. Для предотвращения предпочтения какого-либо из объектов животных каждой экспериментальной группы разделяли на 3 подгруппы и предлагали им разный тип объектов в качестве знакомых и незнакомых. Кроме того, позиции знакомого и незнакомого объектов (правый и левый угол клетки) меняли от животного к животному. После каждого применения объекты тщательно протирали раствором перекиси водорода (6 %).

Этап ознакомления с условиями тестирования и объектам / The stage of familiarization with the testing conditions and objects. Животное помещали в условия теста (пустая клетка с опилками) на 4 минуты для привыкания. Далее, не вынимая животное, в углах клетки по её ширине симметрично размещали 2 идентичных объекта (О1/О1). Животное имело возможность исследовать объекты 4 минуты. Затем животное вынимали из тестовых условий и возвращали в домашнюю клетку.

Тест 1 / Test 1. Через 60 минут в тех же углах экспериментальной клетки, что и во время фазы ознакомления, размещали знакомый объект и незнакомый (О1/О2). Животное помещали в экспериментальную клетку с предустановленными объектами на 4 минуты.

Тест 2 / Test 2. Через 24 часа процедуру повторяли. В углах экспериментальной клетки размещали знакомый объект и новый незнакомый объект (О1/О3). Животное вынимали из домашней клетки, помещали в экспериментальную на 4 минуты и возвращали обратно.

Поведение каждого животного фиксировали на видеокамеру. Обработку видеозаписей осуществляли вручную с помощью компьютерной программы Real Timer (Открытая Наука, Россия). Регистрировали время обследования (Т) и число подходов к каждому объекту за 4 минуты. За акт обследования принимали приближение носа животного к объекту на расстояние не более 2 см. Стойки с опорой на объект без при-

ближения носа к объекту, а также попытки кусания объекта не учитывали.

Коэффициент дискриминации (КД) [12] использовали как показатель предпочтения и, соответственно, распознавания объекта как нового. КД рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{КД} = (\text{Тнов}) / (\text{Тнов} + \text{Тзнак}) \cdot 100 \%,$$

где Тнов — время исследования нового объекта, а Тзнак — время исследования знакомого объекта. Значения КД больше 50 % означают, что животное больше времени исследует новый объект.

Изучение временной динамики исследования объектов и КД в рамках Теста 2 показало, что контрольные животные сильно интересуются объектами и хорошо их различают в первые 2 минуты тестирования, а затем снижают исследовательскую активность или прекращают её для знакомого или нового объектов. В литературе [13] также имеются данные о первых двух минутах как о максимально чувствительном периоде в тесте «Распознавание нового объекта». Исходя из этого мы анализировали КД у всех экспериментальных групп в первые 2 минуты тестирования.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для проверки нормальности распределения использовали W-критерий Шапиро—Уилка. Статистическую значимость различий между выборками оценивали с помощью двухфакторного анализа ANOVA и Fisher LSD в качестве *post hoc* анализа.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

В *Тесте 1*, который проводили через 60 минут после ознакомления с объектами, животные всех групп помнили знакомый объект (КД значительно больше 0,5). Статистических различий между группами по КД выявлено не было (данные не приводятся).

В *Тесте 2*, через 24 ч после ознакомления с объектами, контрольные животные также хорошо помнили знакомый объект (КД в этой группе в среднем составлял 74,1 %). Крысы, получившие скополамин, уделяли сходное время обследованию знакомого и нового объекта или предпочитали обследовать знакомый объект, что свидетельствует об ухудшении долговременной памяти в этой группе. КД в группе «Скополамин» в среднем составлял 51,4 % и был статистически значимо ($p = 0,005$) снижен по сравнению с контрольной группой. ЦПГ в дозе 0,1 мг/кг статистически значимо ($p = 0,02$) восстанавливал ухудшенную память с терапевтическим эффектом около 80 %, КД в этой группе в среднем составлял 69,9 %. В дозе 1 мг/кг ЦПГ не влиял на амнезический эффект скополамина. Сам ЦПГ (без скополамина) в обеих изученных дозах не влиял на поведение крыс в данном тесте. Результаты представлены на рис. 2.

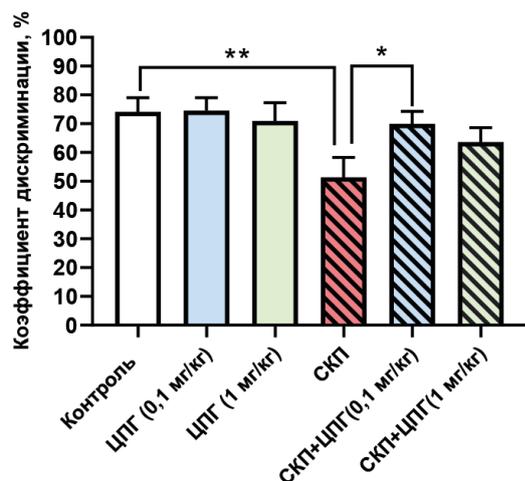


Рис. 2. ЦПГ (0,1 мг/кг, в/б) противодействует нарушению памяти крыс в тесте распознавания нового объекта, индуцированному скополамином

Fig. 2. ЦПГ (CPG) 0.1 mg/kg, i/b counteracts memory impairment in rats in the new object recognition test induced by scopolamine

Примечания: СКП — скополамин. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ по сравнению с группой «СКП» (двухфакторный ANOVA, Fisher LSD тест).

Notes: СКП — scopolamine. The data is presented in the form of averages and standard errors of the mean. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ compared to the "СКП" group (two-factor ANOVA, Fisher LSD test).

Ранее было показано [2, 4], что ЦПГ противодействовал нарушению долговременной памяти крыс в тесте УРПИ в условиях электрошоковой амнезии в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг (в/б) с терапевтическим эффектом 76 и 68 %, соответственно. В настоящем исследовании ЦПГ противодействовал нарушению долговременной памяти, индуцированному скополамином, только в дозе 0,1 мг/кг (в/б) с терапевтическим эффектом около 80 %.

Известно, что в основе УРПИ лежит амигдала-зависимая эмоциональная память, обусловленная страхом, и гиппокамп-зависимая контекстуальная память [14]. В формировании памяти в тесте распознавания нового объекта задействован гиппокамп, а также островковая, периринальная и медиальная префронтальная кора, при этом последняя играет ключевую роль в формировании долговременной памяти в данном тесте [15]. Таким образом, ЦПГ противодействовал нарушениям разных типов долговременной памяти, в основе которых лежат разные нейробиологические субстраты.

Хорошо известно, что процессы памяти ассоциированы с опосредованными мозговым нейротрофическим фактором (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) модуляцией синаптогенеза и синаптической

пластичности [16]. BDNF присутствует практически во всех отделах мозга и является ключевым фактором разных типов памяти, включая память о страхе, пространственную и непространственную память [17].

Ранее в экспериментах *in vitro* было установлено [18], что ЦПГ увеличивает экспрессию BDNF. BDNF-ергический механизм действия ЦПГ был подтвержден с помощью фармакологического ингибиторного анализа с использованием блокатора нейротрофиновых тирозинкиназных Trk рецепторов, соединения K252A, в экспериментах как *in vitro* в отношении нейропротекторной активности [19], так и *in vivo* в отношении анксиолитической и антигипоксической активности [20, 21]. Вышесказанное позволяет предположить, что и ноотропные эффекты ЦПГ опосредованы BDNF. Для установления точных механизмов действия ЦПГ необходимы дополнительные исследования.

Вывод / Conclusion

Нейропептид циклопролилглицин практически полностью противодействует нарушению долговременной памяти у крыс не только в аверсивных условиях теста УРПИ и электрошоковой амнезии, но и в нейтральной ситуации в тесте распознавания нового объекта, когда амнезия была вызвана введением скополамина.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors confirm that there is no conflict of interest.

Участие авторов. Воронцова О. Н. — дизайн эксперимента, выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов, написание текста; Аляева А. Г. — выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов; Колясникова К. Н. — постановка задачи, синтез циклопролилглицина, написание и редактирование текста; Вальдман Е. А. — постановка задачи, дизайн эксперимента; Поварнина П. Ю. — статистический анализ данных, написание текста, подготовка статьи к печати.

Participation of authors. Vorontsova ON — experiment design, experimental work execution, analysis and interpretation of results, text writing; Alyaeva AG — experimental work execution, analysis and interpretation of results; Kolyasnikova KN — problem statement, cycloprolyl glycine synthesis, text writing and editing; Waldman EA — problem statement, experiment design; Povarnina PYu — statistical data analysis, writing the text, preparing the article for publication.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Воронцова Ольга НиколаевнаORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9191-2088>

к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Olga N. VorontsovaORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9191-2088>

PhD, Cand. Sci. (Biology), senior research scientist of the Laboratory of peptide bioregulators of the Department of medicinal chemistry, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Аляева Анна ГригорьевнаORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0371-4370>

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

Anna G. AlyaevaORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0371-4370>

Junior research scientist of the Laboratory of peptide bioregulators of the Department of medicinal chemistry, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Колясникова Ксения НиколаевнаORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6797-692X>

SPIN-код: 5682-2035

к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Ksenia N. KoliashnikovaORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6797-692X>

SPIN code: 5682-2035

PhD, Cand. Sci. (Biology), senior research scientist of the Laboratory of peptide bioregulators of the Department of medicinal chemistry, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Вальдман Елена АртуровнаORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9716-499X>

SPIN-код: 6806-3799

д. м. н., профессор, в. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Elena A. ValdmanORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9716-499X>

SPIN code: 6806-3799

Dr. Sci (Med.), professor, leading researcher of the laboratory of psychopharmacology, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Поварнина Полина Юрьевна**Автор, ответственный за переписку**e-mail: povarnina@gmail.comORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN-код: 5498-6724

к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Polina Yu. Povarnina**Corresponding author**e-mail: povarnina@gmail.comORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN code: 5498-6724

PhD, Cand. Sci. (Biology), senior researcher of the Laboratory of peptide bioregulators of the Department of Chemistry of Medicines, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Максимова Ф.В. и др. Топологические аналоги пирacetama на основе пролина и их ноотропная активность. *Химико-фармацевтический журнал*. 1989;23(3):276–281. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Maksimova FB, et al. Proline-based topologic pyracetam analogs and their nootropic activity. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1989;23(3):276–281. (In Russ.)].
2. Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Letters*. 1996;391:149–152. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00722-3.
3. Kang D, Waldvogel HJ, Wang A, et al. The autocrine regulation of insulin-like growth factor-1 in human brain of Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology*. 2021;127:105191. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2021.105191.
4. Островская Р.У., Мирзоев Т.Х., Романова Г.А. и др. Пролин содержащий дипептид ГВС-111 сохраняет ноотропную активность при пероральном введении. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2001;132(10):404–408. [Ostrovskaya RU, Mirsoev TK, Romanova GA, et al. Proline-containing dipeptide GVS-111 retains nootropic activity after oral administration. *Bull Exp Biol Med*. 2001;132(4):959–962. (In Russ.)]. DOI: 10.1023/a:1013663126973.
5. Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропа цикло-пролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта стереоселективна. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2001;131(5):547–550. [Gudasheva TA, Konstantinopolskii MA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cycloprolylglycine in elevated plus-maze test. *Bull Exp Biol Med*. 2001;131(5):547–550. (In Russ.)]. DOI: 10.1023/a:1017928116025.
6. Povarnina PY, Kolyasnikova KN, Nikolaev SV, et al. Neuropeptide cycloprolylglycine exhibits neuroprotective activity after systemic administration to rats with modeled incomplete global ischemia and in vitro modeled glutamate neurotoxicity. *Bull Exp Biol Med*. 2016 Mar;160(5):653–655. DOI: 10.1007/s10517-016-3241-5.
7. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А. и др. Сходство цикло-пролилглицина с пирacetамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2012;75(9):3–6. [Kolisnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA, et al. Similarity of cycloprolylglycine to piracetam in antihypoxic and neuroprotective effects. *Eksp Klin Farmakol*. 2012;75(9):3–6. (In Russ.)].
8. Sambeth A, Riedel WJ, Smits LT, Blokland A. Cholinergic drugs affect novel object recognition in rats: relation with hippocampal EEG? *Eur J Pharmacol*. 2007;572(2–3):151–159. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.06.018.
9. Zhang R, Lao K, Lu B, et al. (m)RVD-hemopressin (α) and (m)VD-hemopressin (m) improve the memory-impairing effect of scopolamine in novel object and object location recognition tasks in mice. *Peptides*. 2021;136:170442. DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170442.
10. Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*. 2010;215(2):244–254. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.12.036.
11. Волкова А.А., Поварнина П.Ю., Никифоров Д.М. и др. Сравнительное изучение мнемотропной активности димерных дипептидных миметиков отдельных петель NGF и BDNF в тесте распознавания нового объекта у крыс. *Химико-фармацевтический журнал*. 2022;56(4):3–6. [Volkova AA, Povarnina PYu, Nikiforov DM et al. Comparative study of the mnemotropic activity of dimeric dipeptide mimetics of individual NGF and BDNF loops using a new object recognition test in rats. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(4):3–6 (In Russ.)]. DOI: 10.30906/0023-1134-2022-56-4-3-6.
12. Ozawa T, Yamada K, Ichitani Y. d-Cycloserine reverses scopolamine-induced object and place memory deficits in a spontaneous recognition paradigm in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2019 Dec;187:172798. DOI: 10.1016/j.pbb.2019.172798.
13. Dix SL, Aggleton JP. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav Brain Res*. 1999 Mar;99(2):191–200. DOI: 10.1016/s0166-4328(98)00079-5.
14. Malikowska-Racia N, Podkowa A, Salat K. Phencyclidine and scopolamine for modeling amnesia in rodents: direct comparison with the use of Barnes maze test and contextual fear conditioning test in mice. *Neurotox Res*. 2018;34(3):431–441. DOI: 10.1007/s12640-018-9901-7.
15. Tanimizu T, Kono K, Kida S. Brain networks activated to form object recognition memory. *Brain Res Bull*. 2018;141:27–34. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2017.05.017.
16. Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P. Brain-derived neurotrophic factor: a key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:363. DOI: 10.3389/fncel.2019.00363.
17. Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt C:677–683. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.024.
18. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Нейропептид циклопролилглицин увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора в нейрональных клетках. *Доклады Академии наук*. 2016;4:469(1):492–495. DOI: 10.7868/S0869565216220254. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Antipova TA, Seredenin SB. Neuropeptide cycloprolylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells. *Dokl Biochem Biophys*. 2016;469(1):273–276. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S1607672916040104.
19. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Аляева А.Г. и др. Нейропротекторный эффект нейропептида циклопролилглицина зависит от активации AMPA- и TRKB-рецепторов. Доклады российской академии наук. *Науки о жизни*. 2022;507:483–487. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Alyayeva AG et al. Neuroprotective effect of cycloprolylglycine neuropeptide depends on AMPA- and TRKB-receptor activation. *Doklady Rossiyskoy akademii nauk. Nauki o zhizni*. 2022;507:483–487. (In Russ.)]. DOI: 10.31857/S2686738922060099.
20. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Колясникова К.Н. и др. Анксиолитический эффект нейропептида циклопролилглицина опосредован AMPA- и TrkB-рецепторами. *Доклады российской академии наук. Науки о жизни*. 2020;493(1):364–366. DOI: 10.31857/S2686738920040113. [Gudasheva TA, Povarnina PY, Kolyasnikova KN et al. The anxiolytic effect of the neuropeptide cycloprolylglycine is mediated by AMPA and TrkB receptors. *Dokl Biochem Biophys*. 2020;493(1):190–192. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S1607672920040067.
21. Колясникова К.Н., Григоркевич О.С., Аляева А.Г., Гудашева Т.А. Изучение вовлеченности TrkB-рецепторов в антигипоксическое действие нейропептида цикло-пролилглицина. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2022;25(1): 39–42. DOI: 10.29296/25877313-2022-01-06. [Kolyasnikova KN, Grigorkevich OS, Alyayeva AG, Gudasheva TA. Study of the involvement of TrkB receptors in the antihypoxic effect of the neuropeptide cyclo-prolyl-glycine. *Problems of Biological Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2022;25(1):39–42. (In Russ.)]. DOI: 10.29296/25877313-2022-01-06.

Особенности антиаритмического действия соединения АЛМ-802

© Барчуков В. В.¹, Зинченко В. П.², Цорин И. Б.¹, Теплов И. Ю.², Столярук В. Н.¹, Вититнова М. Б.¹, Мокров Г. В.¹, Крыжановский С. А.¹

¹ — ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

² — ФГБУН «Институт биофизики клетки Российской академии наук» (ИБК РАН), Пущино, Российская Федерация

Аннотация. Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются одной из главных причин смерти во всем мире, ежегодно унося более 17 млн жизней. В связи с этим возникает актуальная задача — создание инновационных лекарств для борьбы с ССЗ. Одной из потенциальных мишеней для таких препаратов являются риадиноновые рецепторы 2 типа (RyR2), так как известно, что они играют важную роль в поддержании гомеостаза ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах, а их аномальная активность играет одну из ключевых ролей в генезе нарушений сердечного ритма. **Цель исследования** — изучить механизмы, лежащие в основе антиаритмического действия АЛМ-802. **Методы.** На первом этапе были проведены эксперименты *in vivo* с использованием моделей аконитиновой, хлоридкальциевой, хлоридбариевой и реперфузионных аритмий для оценки антиаритмического эффекта соединения АЛМ-802. На втором этапе исследования в электрофизиологических экспериментах, выполненных на клетках гиппокампа новорожденных крыс, оценивали влияние соединения АЛМ-802 на потенциалзависимые трансмембранные ионные Na^{+} , K^{+} и Ca^{2+} -каналы, а также его влияние на внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} . В экспериментах, выполненных на изолированной полоске миокарда, оценивали влияние соединения АЛМ-802 на активность RyR2. **Результаты.** В экспериментах *in vivo* соединение АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в) на вышеприведенных моделях проявляет выраженную антиаритмическую активность, сопоставимую/превосходящую такую, показанную для эталонных препаратов прокаинамид, верапамил и амиодарон. В экспериментах *in vitro* показано, что АЛМ-802 (69,8 μ M) инициирует инактивацию ионных K^{+} и Na^{+} -каналов и не влияет на активность ионных каналов Ca^{2+} . Соединение АЛМ-802 эффективно предотвращает увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле во время деполяризации. Кроме того, в экспериментах на изолированной полоске миокарда показано, что соединение АЛМ-802 (5×10^{-5} M) блокирует RyR2. **Заключение.** Таким образом, по спектру антиаритмической активности соединение АЛМ-802 сочетает в себе свойства антиаритмических лекарственных средств IA или IC и III классов по классификации E.M. Vaughan Williams. Помимо этого, соединение АЛМ-802 проявляет антагонистическую активность в отношении RyR2. Последнее представляется также достаточно важным, поскольку известно, что в условиях патологии миокарда аномальная активность RyR2 инициирует диастолическую утечку ионов Ca^{2+} из цистерн СПР, что влечёт за собой снижение инотропной функции левого желудочка сердца и значительно повышает риск развития злокачественных нарушений сердечного ритма.

Ключевые слова: соединение АЛМ-802; скрининговые модели аритмий; ионные Na^{+} ; K^{+} и Ca^{2+} -каналы; кофеин; RyR2

Для цитирования:

Барчуков В. В., Зинченко В. П., Цорин И. Б., Теплов И. Ю., Столярук В. Н., Вититнова М. Б., Мокров Г. В., Крыжановский С. А. Особенности антиаритмического действия соединения АЛМ-802. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):56–67. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-56-67>

Поступила: 06.07.2023. **В доработанном виде:** 12.07.2023. **Принята к печати:** 24.07.2023. **Опубликована:** 30.09.2023.

Features of the compound ALM-802 antiarrhythmic action

© Vladimir V. Barchukov¹, Valery P. Zinchenko², Iosif B. Tsoarin¹, Ilya Yu. Teplov², Valery N. Stolyaruk¹, Marina B. Vititnova¹, Grigory V. Mokrov¹, Sergey A. Kryzhanovskii¹

¹ — FSBI "Research Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

² — Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences (ICB RAS), Pushchino, Russian Federation

Abstract. Introduction. Cardiovascular diseases (CVD) remain one of the leading causes of death worldwide, claiming over 17 million lives annually. This highlights the urgent need to develop innovative drugs to combat CVD. One potential target for such drugs is type 2 ryanodine receptors (RyR2), as they play an important role in maintaining ion homeostasis in cardiomyocytes, and their abnormal activity plays a key role in the genesis of cardiac arrhythmias. **Research objective** is to study the mechanisms underlying the antiarrhythmic action of ALM-802. **Methods.** In the first stage, *in vivo* experiments were performed using models of aconitine, calcium chloride, barium chloride arrhythmia, and reperfusion arrhythmias to evaluate the antiarrhythmic effect of the compound ALM-802. The second stage of the study involved electrophysiological experiments performed on hippocampal cells of newborn rats to evaluate the effect of the compound on voltage-gated transmembrane Na^{+} , K^{+} , and Ca^{2+} ion channels, as well as its effect on intracellular ion concentration of Ca^{2+} . Experiments performed on an isolated myocardial strip evaluated the effect of the compound ALM-802 on the activity of RyR2. **Results.** In *in vivo* experiments, the compound ALM-802 (2 mg/kg, iv) exhibits significant antiarrhythmic activity comparable/superior to that shown by the reference drugs procainamide, verapamil, and amiodarone on the models mentioned above. In *in vitro* experiments, it was shown that ALM-802 (69.8 μ M) initiates the inactivation of K^{+} and Na^{+} ion channels and does not affect the activity of Ca^{2+} ion channels. The compound ALM-802 effectively prevents the increase of Ca^{2+} ion concentration in the cytosol during depolarization of contraction. In addition, experiments on isolated myocardial strips showed that the compound ALM-802 (5×10^{-5} M) blocks RyR2. **Conclusion.** Thus, based on the spectrum of its antiarrhythmic activity, the compound ALM-802 combines the properties of antiarrhythmic drugs of class IA or IC and class III according to the E.M. Vaughan Williams classification. In addition, the ALM-802 compound exhibits antagonistic activity towards RyR2. The latter is also considered significant, as it is known that under conditions of myocardial pathology, abnormal activity of RyR2 initiates diastolic leakage of Ca^{2+} ions from the sarcoplasmic reticulum cisterns, which leads to a decrease in the inotropic function of the left ventricle of the heart and significantly increases the risk of developing malignant cardiac arrhythmias.

Keywords: ALM-802 compound; arrhythmia screening models; Na^{+} ; K^{+} and Ca^{2+} channels; caffeine; RyR2

For citations:

Barchukov VV, Zinchenko VP, Tsoarin IB, Teplov IYu, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA. Features of the compound ALM-802 antiarrhythmic action. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):56–67. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-56-67>

Received: 06.07.2023. **Revision received:** 12.07.2023. **Accepted:** 24.07.2023. **Published:** 30.09.2023.

Введение / Introduction

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются наиболее распространённой причиной смерти во всём мире. Согласно результатам систематического метаанализа «Global Burden of Disease Study», оценившего глобальную, региональную и национальную летальность по 282 причинам смерти в 195 странах мира за период 1980–2017 год, ежегодная летальность от ССЗ в мире превышает 17 млн случаев [1]. Как следует из материалов этого анализа за десятилетие, предшествующее 2017 году, число людей, умирающих от ССЗ, увеличилось на 21 %, при этом на ишемическую болезнь сердца (ИБС) и инсульт приходится почти 50 и 35 % смертей от ССЗ, соответственно. В Европе от ССЗ ежегодно умирает около 4 млн человек, что составляет примерно 45 % от общей летальности, при этом на ИБС приходится 44 % смертей от ССЗ, а на цереброваскулярные болезни (в том числе инсульт) 25 % [2]. В РФ летальность от ССЗ также занимает первое место в структуре общей смертности.

Естественно, что поиск и последующее внедрение в широкую клиническую практику отечественных инновационных лекарственных средств представляется актуальной задачей. В этом плане интерес представляют соединения, влияющие на функциональную активность рианодиновых рецепторов 2 типа.

Хорошо известно, что во время деполяризации кардиомиоцитов из цистерн СПР происходит выброс в цитозоль ионов Ca^{2+} , обеспечивающих инотропный ответ клетки. Одним из ключевых игроков в этом процессе являются рианодиновые рецепторы (RyRs), которые наряду с инозитолтрифосфатными рецепторами (IP3R) встроены в мембрану СПР и регулируют выброс ионов Ca^{2+} [3]. Известно, что сокращение кардиомиоцитов обусловлено скоординированным высвобождением ионов Ca^{2+} из цистерн СПР и регулируется экспрессирующимися только в кардиомиоцитах рианодиновые рецепторы 2 типа (RyR2) [4]. В нормальных физиологических условиях открытие RyR2 и высвобождение ионов Ca^{2+} из цистерн СПР происходит в ответ на поступление в цитозоль кардиомиоцитов ионов Ca^{2+} через LTCCs. Ионы Ca^{2+} , высвобождаемые в цитозоль через RyR2-каналы, могут затем дополнительно стимулировать другие RyR2-каналы посредством механизма, называемого «индуцированное Ca^{2+} высвобождение Ca^{2+} » (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) [5], поскольку высвобождающиеся ионы Ca^{2+} связываются с сайтом активации RyR2 [6]. Во время диастолы расслабление кардиомиоцитов происходит в основном в результате поглощения ионов Ca^{2+} СПР, которое происходит при участии Ca^{2+} -АТФазы СПР (SERCA) и вытеснении из клетки ионов Ca^{2+} посредством $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменный белок или NCX), который «выталкивает» 1 ион Ca^{2+} в обмен на 3 иона Na^+ . Другие системы, такие как кальциевый насос плазматической мембраны (Plasma Membrane

Calcium ATPase, PMCA) и митохондриальный Ca^{2+} -унипортер, играют незначительную роль в удалении ионов Ca^{2+} из цитозоля кардиомиоцитов [7]. Следует учитывать, что даже в нормальных физиологических условиях во время диастолы незначительное количество ионов Ca^{2+} просачивается за пределы СПР через RyR2s, вместе с тем их преждевременное открытие имеет очень незначительную вероятность ввиду низкого цитозольного содержания ионов Ca^{2+} [7, 8]. Однако в условиях патологии диастолическая утечка ионов Ca^{2+} играет одну из ключевых ролей в формировании ХСН и инициации нарушений сердечного ритма.

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в течение ряда лет ведутся поиски оригинальных инновационных лекарственных средств, обладающих широким спектром антиаритмической активности. В частности, в ряду линейных алкоксифенилтриазаалканов выявлено соединение N¹–(2,3,4-триметоксибензил)-N²–{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина (шифр АЛМ-802), обладающее выраженной антиаритмической активностью.

Цель настоящего исследования / Research objective — изучение механизмов, лежащих в основе антиаритмического действия соединения АЛМ-802.

Материалы и методы / Materials and Methods

Животные / Animals. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах, изначальной массой 180–200 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Переиздание). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (протокол №1 от 4 ноября 2016 г.).

Эксперименты in vitro / In vitro experiments

Электрофизиологические исследования. В работе использовали смешанную нейроглиальную культуру клеток гиппокампа, выделенную из мозга новорождённых (P1–3) крыс линии Вистар. После декапитации

извлекали мозг и переносили его в чашку Петри с холодным раствором Версена на лёду. Мозг разрезали вдоль, удаляли сосудистые оболочки, средний и задний мозг. Извлекали гиппокамп и переносили в холодный раствор Версена. Далее ткань аккуратно измельчали ножницами и помещали в раствор Версена с добавлением 0,1 % трипсина и инкубировали 10 мин при 37 °С на термошейкере при 600 об/мин. Затем кусочки ткани трижды отмывали нейробазальной средой (Neurobasal A) и диссоциировали путём энергичного пропускания через наконечник пипетки. Полученную суспензию центрифугировали 3 минуты при 300 g. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в нейробазальной среде с добавлением глутамин (0,5 мМ), Supplement B27 (2 %), гентамицин (15 мкг/мл). Готовую суспензию помещали в стеклянные цилиндры со шлифованными торцами с внутренним диаметром 6 мм, поставленные на круглые покровные стекла диаметром 25 мм (VWR International), покрытые полиэтиленгликолем из расчёта 1 гиппокамп на 15 стекол и помещали в 35 мм чашки Петри (Greiner). В каждый цилиндр помещали 100 мкл суспензии клеток и оставляли на 1 ч для прикрепления в CO₂-инкубаторе при 37 °С. После этого цилиндры извлекали, а объём культуральной среды доводили до 1,5 мл. Каждые 3 дня заменяли 2/3 объёма культуральной среды на свежую.

Для анализа изменений мембранного потенциала в работе применяли электрофизиологический метод (пэтч-кламп) в конфигурации whole cell. Исследования проводились на УНУ «Флуоресцентная станция Axio Observer Z1» со встроенным микроинкубатором, электрофизиологической установкой «patch clamp», оснащённой высокоскоростной камерой Hamamatsu ORCA-Flas».

Круглое покровное стекло с культурой клеток монтировали в специальную измерительную камеру. Объём среды в камере составлял 1 мл. Реагенты применялись в непрерывном потоке раствора Хэнкса с помощью специальной перфузионной системы, которая позволяет быстро заменить раствор в камере. Добавление реагентов и отмывку проводили путём замены среды в десятикратном объёме с помощью системы, обеспечивающей перфузию со скоростью 15 мл/мин.

Пипетки изготавливали из мягкого молибденового стекла на пулере P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument Co). Соппротивление полученных пипеток составляло 4–6 МОм. Пипетки заполняли специальным раствором для микропипеток с широкого конца при помощи шприца с пластиковым наконечником.

Для измерения потенциала мембраны нейронов ячейку с покровным стеклом, заполненную 1 мл раствора Хэнкса, устанавливали на заземлённый предметный столик микроскопа Axio Imager Z1. Микроскоп оснащён микроманипулятором для подвода пэтч-пипеток и расположен на столе с воздушной подушкой в камере Фарадея, для исключения механических воздействий

и электрических наводок во время экспериментов. В экспериментальную ячейку помещали индифферентный электрод и трубки перфузионной системы для подачи и отвода среды. Нейроны визуализировались в микроскоп, после чего к клетке микроманипулятором подводилась пэтч-пипетка. Изменения потенциала мембраны регистрировали в режиме фиксации тока, для чего использовался усилитель Axopatch 200B (Molecular Devices), АЦП Digidata 1440A и программное обеспечение pClamp10.2 (Molecular Devices).

Эксперименты проводились с использованием раствора для пэтч-пипетки, содержащего (в мМ) 5 KCl, 130 К-глюконат, 1 MgCl₂ × 6H₂O, 0,25 EGTA, 4 HEPES, 2 Na₂-АТФ, 0,3 Mg-АТФ, 0,3 Na-GTP, 10 Na₂-фосфокреатин (305-310 mOsm, pH 7,2). Внеклеточный р-р Хэнкса, использованный для всех записей, содержал (в мМ): 156 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO₄, 1,25 KH₂PO₄, 1,4 CaCl₂, 10 глюкозы и 10 HEPES, pH 7,35, при температуре 25–28 °С.

Для исследования влияния АЛМ-802 на изменение потенциала мембраны, вызванное активацией потенциалзависимых кальциевых каналов, были использованы культуры возрастом 12–13 дней. Записи производились в режиме фиксации тока. На клетки подавались токовые стимулы различных значений (от 10 до 200 пА с шагом 5 пА), продолжительность стимуляции составляла 1000 мс, интервалы между стимулами — 5 с. Эксперименты проводили в присутствии 100 нМ тетродотоксина во внеклеточном растворе, чтобы, ингибируя натриевые каналы, заблокировать генерацию потенциалов действия. В этих условиях величина ступеньки потенциала мембраны, вызванной токовой стимуляцией нейрона, помимо прочего зависит от активности трансмембранных потенциалзависимых Ca²⁺-каналов, если соединение АЛМ-802 оказывает действие на их активность, значение потенциала мембраны во время стимуляции должно меняться.

Для исследования действия соединения АЛМ-802 производили контрольные записи изменения потенциала мембраны при стимуляции, после чего через систему аппликации в экспериментальную камеру добавляли раствор Хэнкса, содержащий 69,8 мМ АЛМ-802 (данная концентрация эквивалентна эффективной дозе соединения АЛМ-802, определённой в экспериментах *in vivo* — 2 мг/кг, в/в [9, 10]) и производили повторную запись. Затем концентрации изучаемого вещества увеличивали в 2 и 3 раза. Эксперименты с каждой концентрацией соединения АЛМ-802 были повторены не менее чем на 3 культурах. Растворы соединения АЛМ-802 каждый раз готовились непосредственно перед началом эксперимента.

Уровень концентрации внутриклеточного кальция ([Ca²⁺]_i) оценивали с помощью двухволнового зонда Fura-2, по стандартной методике [11]. Для прокрайки клеток использовали эфир Fura-2AM в конечной концентрации 4 мкМ в растворе Хэнкса. На каждое стекло с культурой клеток добавляли 200 мкл свежее-

приготовленного раствора красителя и инкубировали в термостате 40 мин при 37 °С. После этого культуру промывали раствором Хенкса и инкубировали 10–15 мин.

Для измерений $[Ca^{2+}]_i$ использовали систему анализа изображений на основе моторизованного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), оснащённого высокоскоростной CCD-камерой Hamamatsu ORCA-Flash 2.8. Источником возбуждения флуоресценции служил ламповый осветитель Lambda DG-4 Plus (Sutter Instruments, США). Для возбуждения и регистрации флуоресценции Fura-2 мы использовали фильтр 21HE (Carl Zeiss, Германия) с фильтрами возбуждения BP340/30 и BP387/15. Регистрация динамики $[Ca^{2+}]_i$ производилась с частотой 2 кадра в секунду.

Эксперименты на изолированной полоске миокарда. Наркотизированных животных (уретан 1300 мг/кг в/б) фиксировали в положении на спине, после чего быстро извлекали сердце и помещали его в чашку Петри с охлаждённым оксигенированным карбогеном (95 % O_2 и 5 % CO_2) раствором Кребса–Хенслайта (pH = 7,4). Состав раствора Кребса–Хенслайта в мМ: NaCl — 121; KCl — 4,69; KH_2PO_4 — 1,1; $NaHCO_3$ — 23,8; $MgSO_4$ — 1,6; $CaCl_2$ — 1,6; ЭДТА — 0,032; D-глюкоза — 8.

Параллельно продольной оси сердца крыс из правого предсердия иссекали полоску миокарда длиной 8–12 и шириной 1–2 мм, один конец которой крепили вертикально к нержавеющей металлическому стержню, а второй — к изометрическому датчику силы (Radnoti) при помощи лигатуры.

Полоску располагали таким образом, чтобы её середина оказалась между двумя платиновыми электродами, расположенными по бокам на расстоянии 2–3 мм от неё. Затем ткань помещали в резервуар объёмом 5 мл, заполненным раствором Кребса–Хенслайта, параметры которого описаны выше.

Сокращение полоски миокарда вызывали однократными прямоугольными импульсами (4 мс, 10 В, 1 Гц) с помощью электростимулятора HSE (Германия).

Период адаптации ткани перед исследованием длился 40–60 мин, в течение которого постепенно повышали температуру раствора (до 38,0 °С) и корректировали натяжение полоски до уровня, при котором она генерировала максимальную силу сокращения.

Для регистрации сокращений полосок использовали систему регистрации данных PowerLab 8/35, а для обработки полученных результатов — программное обеспечение LabChart 7 Pro.

Статистический анализ. Нормальность распределения полученных данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Так как выборки имели нормальное распределение, то для определения статистической значимости изменений использовали дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Дункану. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Изменения считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Эксперименты *in vivo* / *In vivo experiments*

Аконитиновая модель аритмии. Эксперименты проводили на нелинейных белых крысах-самцах массой 180–200 г. Наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б) животных фиксировали в положении на спине, проводили трахеостомию и подключали к аппарату искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия). Растворы аконитина, изучаемых соединений (в опытных группах) и физиологический раствор (в контрольной группе) вводили болюсом в бедренную вену, объём вводимой жидкости всегда составлял 1 мл на 1 кг массы животного. Политопную экстрасистолию (смешанная предсердно-желудочковая экстрасистолия) вызывали введением раствора аконитина (аконитина гидрохлорид, УФИХ РАН), который готовили *ex tempore* для применения в течение дня. При этом подбирали его минимальную дозу с таким расчётом, чтобы у всех животных контрольной группы в течение 5 минут после введения аконитина развивалась политопная экстрасистолия. Величина подобранной дозы составляла 30–40 мкг/кг. Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (II ст. отведение). За 2 минуты до введения аконитина вводили раствор изучаемого соединения или физиологический раствор и начинали непрерывную регистрацию ЭКГ до 20-й минуты после введения аконитина. Критерием антиаритмического действия изучаемого соединения считали эффект отсутствия политопной экстрасистолии в течение 10 и более минут после введения аконитина.

Животные были рандомизированы на 3 группы: 1-я ($n = 10$) — контроль, 2-я ($n = 6$) — АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в) и 3-я ($n = 6$) — эталонный для этой модели препарат прокаинамид (20 мг/кг, в/в.)

Хлоридкальциевая модель аритмии. Эксперименты проводили на нелинейных белых крысах-самцах массой 220–250 г. Наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б) крыс фиксировали в положении на спине. Растворы изучаемых соединений в опытных группах и физиологический раствор в контрольных группах вводили болюсом в бедренную вену, объём вводимой жидкости всегда составлял 1 мл на 1 кг массы животного. Фибрилляцию желудочков вызывали введением готового 10 % раствора $CaCl_2$. При этом подбирали минимальную дозу $CaCl_2$ за счёт изменения объёма вводимого раствора, с таким расчётом, чтобы у всех животных контрольной группы развивалась фибрилляция желудочков, переходящая в асистолию, и наступала гибель животного. Величина подобранной дозы составляла 125–160 мг/кг (0,29–0,45 мл 10 % $CaCl_2$). Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (II ст. отведение). За 2 минуты до введения $CaCl_2$ вводили раствор изучаемого соединения или физиологический раствор и начинали непрерывную регистрацию ЭКГ вплоть до гибели животного (5 мин после наступления асистолии) либо до 5 мин после восстановления ритма.

Критерием антиаритмического действия изучаемого соединения считали эффект отсутствия нарушений ритма или восстановления нормального ритма после фибрилляции и выживание животного.

Животные были рандомизированы на 3 группы: 1-я ($n = 9$) — контроль, 2-я ($n = 6$) — АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в) и 3-я ($n = 6$) — эталонный для этой модели препарат верапамил (1 мг/кг, в/в).

Хлоридбариевая модель аритмии. Эксперименты проводили на нелинейных белых крысах-самцах массой 220–250 г. Наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б) животных фиксировали в положении на спине. Растворы изучаемых соединений в опытных группах и физиологический раствор в контрольных группах вводили болюсом в бедренную вену, объём вводимой жидкости всегда составлял 1 мл на 1 кг массы животного. Фибрилляцию желудочков вызывали бария хлоридом в дозе 32 мг/кг (использовали раствор в концентрации 3,2 %, приготовленный *ex tempore*). Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (II ст. отведение). За 2 минуты до введения BaCl_2 вводили раствор изучаемого соединения или физиологический раствор и начинали непрерывную регистрацию ЭКГ вплоть до гибели животного (5 минут после наступления асистолии) либо до 5 минут после восстановления ритма. Критерием антиаритмического действия изучаемого соединения считали эффект отсутствия нарушений ритма или восстановления нормального ритма после фибрилляции и выживание животного.

Животные были рандомизированы на 3 группы: 1-я ($n = 6$) — контроль, 2-я ($n = 6$) — АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в) и 3-я ($n = 6$) — эталонный для этой модели препарат амиодарон (10 мг/кг, в/в).

Модель реперфузионных аритмий. Эксперименты проводили на нелинейных белых крысах-самцах массой 220–250 г. Наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б) животных фиксировали в положении на спине, проводили трахеостомию и подключали к аппарату искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия). Растворы изучаемых соединений в опытных группах и физиологический раствор в контрольных группах вводили болюсом в бедренную вену, объём вводимой жидкости всегда составлял 1 мл на 1 кг массы животного. Для воспроизведения реперфузионной аритмии перевязывали коронарную артерию с последующим снятием лигатуры. Для этого формировали хирургический доступ к коронарной артерии. Посредством торакотомии во втором и пятом межреберьях перевязывали маммарные артерии, внутренние грудные вены и производили гемистернэктомию с костэктомией 3- и 4-го ребра, вскрывали перикард и под левую коронарную артерию (или её крупные ветви), в области выхода артерии из-под ушка, подводили лавсановую лигатуру. Ишемию миокарда вызывали одномоментной перевязкой коронарной артерии, а через 7 минут ишемии лигатуру снимали. Раствор изучаемого соединения

или физиологический раствор вводили за 5 минут до реперфузии. Регистрацию ЭКГ (II ст. отведение) начинали за минуту до перевязки коронарного сосуда и продолжали в течение всего эксперимента. Затем подсчитывали число животных, у которых возникали жизнеугрожающие нарушения ритма сердца (фибрилляции желудочков или желудочковые тахикардии). Критерием антиаритмического действия изучаемого соединения считали эффект отсутствия жизнеугрожающих нарушений ритма.

Животные были рандомизированы на 4 группы: 1-я ($n = 12$) — контроль, 2-я ($n = 13$) — АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в), 3-я ($n = 8$) — эталонный для этой модели препарат верапамил (1 мг/кг, в/в) и 4-я ($n = 6$) — эталонный для этой модели препарат прокаинамид (20 мг/кг, в/в).

Статистический анализ. Полученные результаты обрабатывали с помощью метода точной вероятности Фишера с учётом множественности сравнений.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

На первом этапе исследований оценивали антиаритмическую активность соединения АЛМ-802 на скрининговых моделях аритмий в сравнении с эталонными для этих моделей лекарственными средствами.

Аконитиновая модель аритмии. Хорошо известно, что аритмогенный эффект аконитина связан с его способностью изменять/искажать работу быстрых трансмембранных потенциалзависимых натриевых Na^+ -каналов, встроенных в клеточную мембрану, преимущественно кардиомиоцитов предсердий. Аконитин имеет высокое сродство к сайту 2 на α -субъединице Na^+ -каналов [12]. В результате взаимодействия аконитина с каналом происходит подавление его конформационных изменений и канал переходит в открытое состояние и, как следствие этого, из-за постоянного притока ионов Na^+ мембрана кардиомиоцитов остаётся деполяризованной, так как не может реполяризоваться. Из-за сильной деполяризации клетки проницаемость её мембраны резко возрастает и для ионов Ca^{2+} , что влечёт за собой перегрузку ими кардиомиоцитов [13]. Помимо этого, имеются данные о том, что аконитин подавляет и селективность Na^+ -каналов и через них вместо ионов Na^+ в кардиомиоциты начинают транспортироваться ионы более крупного размера, например NH_4^+ [14, 15]. Известно, что на данной экспериментальной модели наиболее эффективными являются антиаритмики I класса по классификации E.M. Vaughan Williams [16].

Результаты экспериментов представлены в табл. 1.

Как следует из полученных данных, в условиях настоящей модели соединение АЛМ-802 проявляет выраженную антиаритмическую активность, сопоставимую с таковой у эталонного препарата прокаинамида.

Хлоридкальциевая модель аритмии. Модель хлоридкальциевых аритмий как инструмент поиска лекарственных средств для лечения нарушений сердечного ритма широко используется с начала 50-х

Таблица 1

Влияние соединения АЛМ-802 и эталонного препарата прокаинамид на нарушения ритма сердца, вызываемые аконитина гидрохлоридом у крыс

Table 1

The effect of the compound ALM-802 and the reference drug procainamide on heart rhythm disorders induced by aconitine hydrochloride in rats

Соединение	Доза, мг/кг	Число крыс в группе	Число крыс с фибрилляцией желудочков и асистолией	p — по отношению к контролю
Контроль	—	10	10	—
АЛМ-802	2	6	0	0,0003
Прокаинамид	20	6	1	0,0027

годов XX века. Изначально полагали, что аритмии, инициируемые CaCl_2 , носят центральный характер и связаны с гиперактивацией сосудодвигательного центра продолговатого мозга [17]. Однако эта концепция вызывала определённые возражения, поскольку CaCl_2 инициировал нарушения сердечного ритма и в экспериментах на изолированном сердце [18]. Позднее было показано, что повышенная концентрация ионов Ca^{2+} в клетках синоатриального узла вызывает гиперполяризацию потенциала покоя, а также снижение возбудимости клеток Пуркинье, поскольку они имеют менее отрицательный пороговый потенциал [19]. Кроме того, было показано, что CaCl_2 ускоряет реполяризацию клеток Пуркинье [20]. Это различие приводит к асинхронному восстановлению возбудимости в предсердиях и желудочках сердца, что может способствовать формированию аритмии по типу *reentry*. Следует отметить, что в 2020 году была опубликована статья Gou D. с соавт., из материалов которой следует, что CaCl_2 -опосредованные аритмии связаны не с избыточным поступлением в кардиомиоциты экзогенных ионов Ca^{2+} , а с активацией (гиперфосфорилированием) в них Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII- δ) [21]. Известно, что CaMKII- δ , преобладающая в кардиомиоцитах [22], является одним из ключевых игроков, регулирующих активность множества как цитозольных, так и ядерных мишеней [23]. В частности, избыточное аутофосфорилирование CaMKII инициирует аритмогенез как посредством ак-

тивации специфичных для кардиомиоцитов (RyR2) [24, 25], так и путём CaMKII-опосредованной, зависимой от фосфорилирования модуляции активности ворот инактивации $\text{Na}^+v1.5$ каналов, также специфичных для кардиомиоцитов [26]. На данной модели аритмий обычно проявляют активность соединения, относящиеся к I и IV классам антиаритмиков по классификации E.M. Vaughan Williams [16].

Результаты экспериментов представлены в табл. 2.

Как следует из полученных данных, в условиях настоящей модели соединение АЛМ-802 проявляет выраженную антиаритмическую активность и превосходит таковую у эталонного препарата верапамил.

Хлоридбариевая модель аритмии. Хлоридбариевая модель аритмии как инструмент поиска лекарственных средств для лечения нарушений сердечного ритма достаточно часто используется с середины 60-х годов XX века [27]. К настоящему времени механизмы, за счёт которых хлорид бария инициирует развитие нарушений сердечного ритма, достаточно хорошо изучены. Показано, что ионы Ba^{2+} являются классическими проникающими блокаторами K^+ -каналов [28]. Эффект «внешней блокировки» связан со способностью ионов Ba^{2+} селективно связываться с K^+ -каналами в области их проницаемой поры [28]. Самая узкая часть проницаемой поры, её «селективный фильтр», образована высококонсервативным мотивом TVGYG, связанным с основными карбонильными атомами кислорода и направленным к центральному просвету

Таблица 2

Влияние соединения АЛМ-802 и эталонного препарата верапамил на нарушения ритма сердца, вызываемые кальция хлоридом у крыс

Table 2

The effect of the compound ALM-802 and the reference drug verapamil on heart rhythm disorders induced by calcium chloride in rats

Шифр соединения	Доза, мг/кг	Число крыс в группе	Число крыс с фибрилляцией желудочков и асистолией	p — по отношению к контролю
Контроль	—	9	9	—
АЛМ-802	2	6	0	< 0,001
Верапамил	1	6	2	0,015

поры. Расчёты рентгеновской кристаллографии и молекулярной динамики выявили пять сайтов связывания ионов вдоль узкой поры, от самого внешнего сайта S0 до самого внутреннего сайта S4. Теми же методами показано, что ионы Ba^{2+} могут связываться с сайтами S4 и S2 и тем самым препятствуют выходу ионов K^+ в межклеточное пространство [29], что способствует нарушению процессов реполяризации/ постдеполяризации кардиомиоцитов и инициирует развитие злокачественных нарушений сердечного ритма. Также следует отметить, что ионы Ba^{2+} , блокируя трансмембранные потенциалзависимые K^+ -каналы, не влияют на трансмембранный ток ионов Na^+ [30]. Известно, что на данной экспериментальной модели наиболее эффективными являются антиаритмики III класса по классификации E.M. Vaughan Williams [16].

Результаты экспериментов представлены в табл. 3.

Как следует из полученных данных, в условиях настоящей модели соединение АЛМ-802 проявляет выраженную антиаритмическую активность и превосходит таковую у эталонного препарата амиодарон.

Модель реперфузионных аритмий. Безусловно, в условиях острой ишемии миокарда реперфузия целесообразна, поскольку позволяет не только восстановить доставку кислорода и питательных веществ, необходимых для поддержания нормального клеточного метаболизма, но и удалить из зоны ишемии накопившиеся в ней токсические продукты. Однако, как не парадоксально, реперфузия сама по себе может спровоцировать дальнейшее повреждение кардиомиоцитов, в частности инициировать развитие злокачественных нарушений сердечного ритма. Реперфузионное повреждение миокарда было впервые описано Робертом Дженнингсом в 1960 году [31]. 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 [32]. Реперфузия сопровождается быстрым восстановлением внутриклеточ-

ного pH за счёт активации сарколеммального Na^+/H^+ ионообменника, который «выталкивает» протоны из клетки в обмен на поступление в цитозоль ионов Na^+ [32, 33]. Возникающее в результате этого увеличение содержания в цитозоле кардиомиоцитов ионов Na^+ , в свою очередь, активирует сарколеммальный Na^+/Ca^{2+} ионообменник, что приводит к обмену внутриклеточных ионов Na^+ на внеклеточные ионы Ca^{2+} [34]. Высокая скорость работы Na^+/Ca^{2+} ионообменника может в конечном итоге привести к перегрузке кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} , которые, в частности, инициируют выработку АФК в митохондриях [35, 36]. 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 ионам Ca^{2+} многократно увеличивается в условиях сопутствующего реперфузии окислительного стресса [37]. Этот феномен получил название АФК-индуцированный выход АФК («ROS-induced ROS releas» (RIRR)) [38]. Избыточное накопление ионов Ca^{2+} и выработка АФК создают идеальную внутриклеточную среду для активации СаМКП, которая играет главную роль в генерации реперфузионных аритмий [39]. Свои аритмогенные эффекты СаМКП реализует посредством фосфорилирования и последующей активации RyR2 [40]. Известно, что на данной экспериментальной модели наиболее эффективными являются антиаритмики IA, IC и IV класса по классификации E.M. Vaughan Williams [16].

Результаты экспериментов представлены в табл. 4.

Как следует из полученных данных, в условиях настоящей модели соединение АЛМ-802 проявляет выраженную антиаритмическую активность и превосходит таковую у эталонных препаратов верапамил и прокаинамид.

Таким образом, результаты скрининговых экспериментов свидетельствуют о том, что соединение АЛМ-802 на всех использованных моделях проявляет выраженную антиаритмическую активность, в подавляющем большинстве случаев превосходящую таковую

Таблица 3

Влияние соединения АЛМ-802 и эталонного препарата амиодарон на нарушения ритма сердца, вызываемые бария хлоридом у крыс

Table 3

The effect of the compound ALM-802 and the reference drug amiodarone on heart rhythm disorders induced by barium chloride in rats

Шифр соединения	Доза, мг/кг	Число крыс в группе	Число крыс с фибрилляцией желудочков и асистолией	p — по отношению к контролю
Контроль	—	6	6	
АЛМ-802	2	6	1	0,03
Амиодарон	10	7	5	0,96

Влияние соединения АЛМ-802 и эталонных препаратов верапамил и прокаинамид на жизнеугрожающие нарушения ритма сердца, вызываемые окклюзией / реперфузией коронарной артерии у крыс

Table 4

The effect of the compound ALM-802 and reference drugs verapamil and procainamide on life-threatening cardiac rhythm disturbances induced by coronary artery occlusion/reperfusion in rats

Шифр соединения	Доза, мг/кг	Число крыс в группе	Число крыс с ЖТ и/или ФЖ	<i>p</i> — по отношению к контролю
Контроль	—	10	10	—
АЛМ-802	2	13	2	<0,001
Верапамил	1	8	3	0,0108
Прокаинамид	20	6	1	0,0151

у эталонных препаратов. Есть основания полагать, что соединение АЛМ-802 сочетает в себе свойства антиаритмиков I, III и IV класса по классификации E.M. Vaughan Williams, однако однозначный ответ на этот вопрос можно получить только в экспериментах *in vitro* при проведении электрофизиологических с использованием метода пэтч-кламп.

Эксперименты *in vitro* / *In vitro* experiments

Изучение влияния соединения АЛМ-802 на трансмембранные Na⁺-, K⁺- и Ca²⁺-каналы

Для исследования влияния соединения АЛМ-802 на трансмембранные Na⁺-, K⁺- и Ca²⁺-каналы производились контрольные записи вызванных потенциалов, после чего через систему аппликации в экспериментальную камеру производилась добавка раствора Хэнкса, содержащего 69,8 мМ АЛМ-802 (данная концентрация эквивалентна эффективной дозе соединения АЛМ-802 — 2 мг/кг, в/в, известной из экспериментов *in vivo*), и производилась повторная запись.

Показано, что соединение АЛМ-802 вызывает уменьшение амплитуды и частоты потенциалов действия, что может говорить об ингибировании трансмембранных потенциалзависимых ионных Na⁺- и инактивации K⁺-каналов.

Для оценки влияния соединения АЛМ-802 на трансмембранные потенциалзависимые ионные Ca²⁺-каналы были произведены аналогичные эксперименты в присутствии 100 нМ тетродотоксина во внеклеточном растворе. Когда заблокирована генерация потенциалов действия, величина ступеньки потенциала мембраны, вызванной токовой стимуляцией нейрона, помимо прочего зависит от активности трансмембранных потенциалзависимых ионных Ca²⁺-каналов, и, если соединение АЛМ-802 оказывает действие на их активность, значение потенциала мембраны во время стимуляции должно меняться. Эти изменения не были обнаружены ни при добавке 69,8 мМ соединения АЛМ-802, ни при двух- и трёхкратном увеличении его концентрации.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что соединение АЛМ-802 в условиях настоящего эксперимента инициирует инактивацию трансмембранных потенциалзависимых ионных K⁺- и Na⁺-каналов и не влияет на активность трансмембранных потенциалзависимых ионных Ca²⁺-каналов.

Изучение влияния соединения АЛМ-802 на повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺, вызванное деполяризацией

Известно, что интенсивная и постоянная деполяризация нейронов переводит их в гипервозбужденное состояние, которое характеризуется повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺, вызванным как притоком ионов Ca²⁺ в клетку через медленные трансмембранные потенциалзависимые ионные Ca²⁺-каналы (LTCCs), так и за счёт выброса ионов Ca²⁺ из СПР, в результате чего происходит переключение нейронов в режим пачечной активности. Показано, что добавление в среду 35 мМ KCl приводит к сильной деполяризации всех клеток, при этом в их цитозоле повышается концентрация ионов Ca²⁺. Соединение АЛМ-802 (69,8 мМ) в существенной мере препятствует увеличению амплитуды кальциевого ответа, вызванного добавлением в среду KCl (рис. 1).

Таким образом, с помощью двухволнового зонда Fura-2 продемонстрировано, что соединение АЛМ-802 во время деполяризации эффективно препятствует повышению концентрации ионов Ca²⁺ в цитозоле нейронов. Механизм этого эффекта соединения АЛМ-802 не ясен и требует дальнейшего изучения, однако поскольку было показано, что соединении АЛМ-802 не влияет на активность LTCCs, можно было предположить, что уменьшение под его влиянием кальциевого ответа при деполяризации мембраны обусловлено ингибированием соединением АЛМ-802 выброса ионов Ca²⁺ из цистерн СПР.

Для ответа на этот вопрос было изучено влияние соединения АЛМ-802 на активность RyR2.

Изучение влияния соединения АЛМ-802 на риаодиновые рецепторы

Опыты по изучению влияния соединения АЛМ-802 на риаодиновые рецепторы проводили на изолированной полоске миокарда.

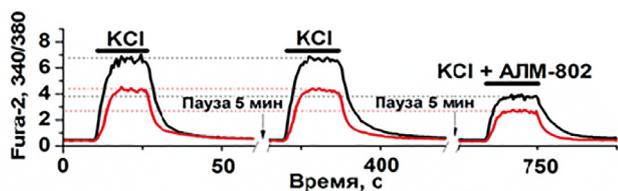


Рис. 1. Влияние АЛМ-802 на повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , вызванное деполяризацией 35 мМ КСl в быстро (чёрная линия) и медленно (красная линия) отвечающих нейронах

Fig. 1. The effect of ALM-802 on the increase in intracellular Ca^{2+} concentration induced by depolarization with 35 mM KCl in fast-responding neurons (black line) and slow-responding neurons (red line)

Примечания: Пример записей ответа быстро отвечающего (чёрная линия) и медленно отвечающего (красная линия) нейрона на добавку 35 мМ КСl. В контроле при повторных добавках с паузой в 5 минут амплитуда Ca^{++} ответа не меняется. Третья добавка КСl в присутствии 69,8 μM АЛМ-802. Показано заметное снижение амплитуды Ca^{++} -ответа.

Notes: An example of the records of the response of a fast-responding (black line) and slow-responding (red line) neuron to the addition of 35 mM CSl. In the control, with repeated supplements with a pause of 5 minutes, the amplitude of the Ca^{++} response does not change. The third additive is KCl in the presence of 69.8 μM ALM-802. A noticeable decrease in the amplitude of the Ca^{++} response is shown.

Таблица 5

Влияние соединения АЛМ-802 (1×10^{-5} М) на амплитуду сокращений (V) полоски миокарда правого предсердия крысы, вызываемого кофеином (5×10^{-5} М)

Table 5

The effect of ALM-802 (1×10^{-5} M) on the amplitude of contractions (V) of the strip of the right atrial myocardium in rats induced by caffeine (5×10^{-5} M)

Исходный уровень	Кофеин	
$0,117 \pm 0,018$, $n = 6$	$0,239 \pm 0,039^*$	
Исходный уровень	АЛМ-802 $n = 6$	АЛМ-802 + кофеин
$0,132 \pm 0,040$, $n = 6$	$0,049 \pm 0,012^*$	$0,024 \pm 0,006^*$

Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; * — $p < 0,05$ по отношению к исходному уровню.

Notes: Arithmetic averages and their standard errors are shown; * — $p < 0.05$ relative to the initial level.

Результаты экспериментов представлены в табл. 5.

Как следует из полученных данных, агонист RyRs кофеин значимо ($p < 0,05$) увеличивает амплитуду сокращений полоски миокарда. Соединение АЛМ-802 в существенной мере уменьшает амплитуду сокращений изолированной полоски миокарда ($p < 0,05$) и полностью блокирует положительный инотропный ответ полоски на кофеин (см. табл. 5).

Результаты, полученные в этой серии, свидетельствуют о том, что соединение АЛМ-802 полностью блокирует положительный инотропный ответ агониста RyRs кофеина, что позволяет полагать, что соединению АЛМ-802 присущи свойства антагониста RyR2, поскольку в миокарде экспрессируются риадиноновые рецепторы только 2-го типа [4].

Заключение / Conclusion

Таким образом, полученные результаты позволяют с большой долей уверенности говорить о том, что по спектру антиаритмической активности соединение АЛМ-802 сочетает в себе свойства антиаритмических лекарственных средств IA или IC и III классов по классификации E.M. Vaughan Williams и, согласно данным скрининговых экспериментов, по своей целевой активности преимущественно превосходит эталонные препараты прокаинамид и амиодарон. Помимо этого, соединение АЛМ-802 проявляет антагонистическую активность в отношении RyR2. Последнее представляется также достаточно важным, поскольку известно, что в условиях патологии миокарда аномальная активность RyR2 инициирует диастолическую утечку ионов Ca^{2+} из цистерн СПР, что влечёт за собой снижение инотропной функции левого желудочка сердца и значительно повышает риск развития злокачественных нарушений сердечного ритма.

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

Зинченко Валерий Петрович

e-mail: vpz@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1990-3803>
 SPIN-код: 5114-0738

д. б. н., зав. лабораторией внутриклеточной сигнализации ИБК РАН, Пущино, Российская Федерация, Пущино, Российская Федерация

Valery P. Zinchenko

e-mail: vpz@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1990-3803>
 SPIN code: 5114-0738

Dr. Sci. (Biol.), Head of laboratory of intracellular signaling ICB RAS, Pushchino, Russian Federation

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

Теплов Илья Юрьевич

e-mail: t.i.y@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8333-2294>
 SPIN-код: 2478-5555

к. б. н., н. с. лаборатории внутриклеточной сигнализации ИБК РАН, Пущино, Российская Федерация, Пущино, Российская Федерация

Илья Ю. Теплов

e-mail: t.i.y@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8333-2294>
 SPIN code: 2478-5555

PhD, Cand. Sci. (Biology), Researcher of laboratory of intracellular signaling ICB RAS, Pushchino, Russian Federation

Столярук Валерий Николаевич

e-mail: vns539@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: vns539@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”, 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

Мокров Григорий Владимирович

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

Grigory V. Mokrov

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

Крыжановский Сергей Александрович

Автор, ответственный за переписку

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

Corresponding author

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

Список литературы / References

- Roth GA. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1736–1788. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
- Timmis A, Vardas P, Townsend N, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J*. 2022;43(8):716–799. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab892.
- Santulli G, Lewis D, des Georges A, et al. Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Subcell Biochem*. 2018;87:329–352. DOI: 10.1007/978-981-10-7757-9_11.
- Nakai J, Imagawa T, Hakamat Y, et al. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett*. 1990;271(1-2):169–177. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80399-4.
- Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. 1983;245(1):C1–14. DOI: 10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198–205. DOI: 10.1038/415198a.
- Benitah JP, Perrier R, Mercadier JJ et al. RyR2 and Calcium Release in Heart Failure. *Front Physiol*. 2021;12:734210. DOI: 10.3389/fphys.2021.734210.
- Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Valdivia HH, et al. Luminal Ca²⁺ controls termination and refractory behavior of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2002;91(5):414–420. DOI: 10.1161/01.res.0000032490.04207.bd.
- Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б. и др. Скрининг кардиотропной активности в ряду α , ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2016;(2):10–13. [Kryzhanovskii SA, Likhosherstov AM, Tsorin IB et al. Screening of the compounds having cardiotropic activity among the α , ω -diarilmetil derivatives of bis-(ω -aminoalkyl)amines. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*. 2016;(2):10–13. (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, Varchukov 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.
- Hayashi H, Miyata H. Fluorescence imaging of intracellular Ca²⁺. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1994;31(1):1–10. DOI: 10.1016/1056-8719(94)90023-x.
- Taylor CP, Meldrum BS. Na⁺ channels as targets for neuroprotective drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16(9):309–316. DOI: 10.1016/s0165-6147(00)89060-4.
- Gutsier UT, Gleitz J. The alkaloid 6-benzoylhetatisine inhibits voltage-gated Na⁺ channels in rat brain synaptosomes. *Neuropharmacology*. 1998;37(9):1139–1146. DOI: 10.1016/s0028-3908(98)00114-2.
- Наумов А.П., Негуляев Ю.А., Носырева Е.Д. Изменение сродства кислотной группы натриевого канала к ионам водорода при действии аконитина. *Доклады АН СССР*. 1979;244(1):229–32. [Naumov AP, Neguliaev YA, Nosyreva ED. Changes in the affinity of the acidic group of the sodium channel for hydrogen ions following exposure to aconitine. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1979;244(1):229–232. (In Russ.)].
- Гриценко И.И., Zubov A.H., Наумов А.П. Модификация натриевых каналов мембран клеток нейробластомы аконитином. *Цитология*. 1982;24(6):658–666. * [Grishchenko II, Zubov AN, Naumov AP. Aconitine modification of cell membrane sodium channels of a neuroblastoma. *Tsitologiya*. 1982;24(6):658–666. (In Russ.)].
- Галенко-Ярошевский П.А., Каверина Н.В., Камкин А.Г. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств. / под ред. Миронов А.Н. Бунатян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2013:385–416. [Galenko-Yaroshevsky PA, Kaverina NV, Kamkin AG et al. Methodological recommendations for the preclinical study of antiarrhythmic drugs. Ed by Mironov AN, Bunatyan ND, et al. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part One. Moscow: Grif i K; 2012:385–416. (In Russ.)].
- Malinow MR, Battle FF, Malamud B. Nervous mechanisms in ventricular arrhythmias induced by calcium chloride in rats. *Circ Res*. 1953;1(6):554–559. DOI: 10.1161/01.res.1.6.554.
- Grumbach L, Howard JW, Merrill VI. Factors related to the initiation of ventricular fibrillation in the isolated heart; effect of calcium and potassium. *Circ Res*. 1954;2(5):452–459. DOI: 10.1161/01.res.2.5.452.
- Trautwein W. Generation and conduction of impulses in the heart as affected by drugs. *Pharmacol Rev*. 1963;15:277–332.
- Temte JV, Davis LD. Effect of calcium concentration on the transmembrane potentials of Purkinje fibers. *Circ Res*. 1967;20(1):32–44. DOI: 10.1161/01.res.20.1.32.
- Gou D, Pei X, Wang J, et al. Antiarrhythmic effects of ginsenoside Rg2 on calcium chloride-induced arrhythmias without oral toxicity. *J Ginseng Res*. 2020;44(5):717–724. DOI: 10.1016/j.jgr.2019.06.005.

22. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, et al. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1999;84(6):713–721. DOI: 10.1161/01.res.84.6.713.
23. Takla M, Huang CL, Jeevaratnam K. The cardiac CaMKII-Na(v)1.5 relationship: From physiology to pathology. *J Mol Cell Cardiol*. 2020;139:190–200. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.12.014.
24. McCauley MD, Wehrens XH. Ryanodine receptor phosphorylation, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, and life-threatening ventricular arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med*. 2011;21(2):48–51. DOI: 10.1016/j.tcm.2012.02.004.
25. Camors E, Valdivia HH. CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol*. 2014;5:101. DOI: 10.3389/fphar.2014.00101.
26. Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3127–3138. DOI: 10.1172/JCI26620.
27. Szekeres L, Papp JG. Experimental cardiac arrhythmias. Ed by Schmier J, Eichler O. *Experimental Production of Diseases: Heart and Circulation. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. XVI/3*. NY: Springer-Verlag; 1975:131–182.
28. Rohaim A, Gong L, Li J, et al. Open and Closed Structures of a Barium-Blocked Potassium Channel. *J Mol Biol*. 2020;432(17):4783–4798. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.06.012.
29. Jiang Y, MacKinnon R. The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J Gen Physiol*. 2000;115(3):269–272. DOI: 10.1085/jgp.115.3.269.
30. Rowley CN, Roux B. A computational study of barium blockades in the KcsA potassium channel based on multi-ion potential of mean force calculations and free energy perturbation. *J Gen Physiol*. 2013;142(4):451–463. DOI: 10.1085/jgp.201311049.
31. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68–78.
32. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123(1):92–100. DOI: 10.1172/JCI62874.
33. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *Exs*. 1996;76:99–114. DOI: 10.1007/978-3-0348-8988-9_7.
34. Bond JM, Chacon E, Herman B, Lemasters JJ. Intracellular pH and Ca²⁺ homeostasis in the pH paradox of reperfusion injury to neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1993;265(1 Pt 1):C129–137. DOI: 10.1152/ajpcell.1993.265.1.C129.
35. Mattiazzi A, Argenziano M, Aguilar-Sanchez Y, Mazzocchi G, Escobar AL. Ca²⁺ Sparks and Ca²⁺ waves are the subcellular events underlying Ca²⁺ overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;79:69–78. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.011.
36. Bagheri F, Khori V, Alizadeh AM, et al. Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: Mechanisms and therapies. *Life Sci*. 2016;165:43–55. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.09.013.
37. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C817–833. DOI: 10.1152/ajpcell.00139.2004.
38. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909–950. DOI: 10.1152/physrev.00026.2013.
39. Ling H, Gray CB, Zambon AC, et al. Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II δ mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through nuclear factor- κ B. *Circ Res*. 2013;112(6):935–944. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.276915.
40. 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;311(3):H713–724. DOI: 10.1152/ajpheart.00142.2016.

Исследование поведенческих эффектов новых фосфорилированных тиосемикарбазидов в эксперименте

© Никитина А. В.¹, Семина И. И.¹, Никитин Д. О.¹, Гаврилова Е. Л.²,
Бурангулова Р. Н.², Крутов И. А.², Исаева А. О.²

¹ — ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Казань, Российская Федерация

² — ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, Российская Федерация

Аннотация. Актуальность. Известно, что существующая лекарственная терапия когнитивных расстройств характеризуется невысокими показателями эффективности и безопасности, а также симптоматической направленностью. Поэтому изыскание новых лекарственных средств в данной сфере является актуальным вопросом, решением которого могут стать фосфорилированные производные тиосемикарбазидов (ФТК), обладающие мультитаргетным механизмом действия. **Цель.** Изучение острой токсичности и влияния на поведение мышей ФТК. **Методы.** Объекты исследования — 2 новых соединения ряда ФТК: 2-[2-(Дифенилфосфорил)ацетил]гидразинкарботиоамид (Т7) и 2-[2-(Дифенилфосфорил)ацетил]-N-фенилгидразинкарботиоамид (Т8). Препарат сравнения — гидразид дифенилфосфорилуксусной кислоты (фосеназид). После определения острой токсичности при внутрибрюшинном однократном введении, влияние ФТК на поведение мышей изучено на моделях «Открытое поле» (ОП), «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «Тёмно-светлая камера» (ТСК) и «Поведенческое отчаяние» (ПО). Для статистического анализа применяли программу GraphPadPrism 8.0.1 с вычислением t-критерия Стьюдента. **Результаты.** Установлено, что новые ФТК обладают меньшей токсичностью по сравнению с фосеназидом. Поведенческое тестирование показало, что в/б введение Т8 способствовало увеличению исследовательской (6 и 12 мг/кг) и двигательной (12 мг/кг) активности на модели ОП, развитию анксиолитического эффекта в тестах ПКЛ (12 мг/кг) и ТСК (6 мг/кг), а в тесте ПО (12 мг/кг) — антидепрессивного действия. При в/б введении Т7 отмечалось увеличение двигательной активности в тесте ОП (16 мг/кг). **Вывод.** Соединения ряда ФТК являются перспективными для дальнейшего синтеза и разработки в качестве потенциальных лекарственных препаратов с различным спектром психотропной активности.

Ключевые слова: фосфорилированные тиосемикарбазиды; открытое поле; приподнятый крестообразный лабиринт; тёмно-светлая камера; психотропные свойства

Для цитирования:

Никитина А. В., Семина И. И., Никитин Д. О., Гаврилова Е. Л., Бурангулова Р. Н., Крутов И. А., Исаева А. О. Исследование поведенческих эффектов новых фосфорилированных тиосемикарбазидов в эксперименте. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):68–76. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-68-76>

Поступила: 07.08.2023. В доработанном виде: 15.08.2023. Принята к печати: 02.09.2023. Опубликовано: 30.09.2023.

Experimental investigation of the behavioral effects of new phosphorylated thiosemicarbazides

© Anastasiya V. Nikitina¹, Irina I. Semina¹, Dmitry O. Nikitin¹, Elena L. Gavrilova², Ramilya N. Burangulova², Ivan A. Krutov², Anastasia O. Isaeva²

¹ — FSBEI HE Kazan SMU MOH Russia, Kazan, Russian Federation

² — Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

Abstract. Relevance. It is known that the existing drug therapy for cognitive disorders is characterized by low rates of efficacy and safety, as well as symptomatic orientation. Therefore, the search for new drugs in this area is an urgent issue, the solution of which can be phosphorylated derivatives of thiosemicarbazides (PTC), which have a multitarget mechanism of action. **Aim.** Study of acute toxicity and behavioral effects of PTC in mice. **Methods.** The objects of study are 2 new compounds of the PTC series: 2-[2-(Diphenylphosphoryl)acetyl]hydrazinocarbothioamide (T7) and 2-[2-(Diphenylphosphoryl)acetyl]-N-phenylhydrazinocarbothioamide (T8). The reference drug is diphenylphosphorylacetic acid hydrazide (fosenaazid). After determining the acute toxicity with a single intraperitoneal injection, the effect of PTK on the behavior of mice was studied in the models "Open field" (OP), "Elevated plus maze" (EPM), "Dark-light chamber" (DLC) and "Behavioral despair" (BD). For statistical analysis, the GraphPadPrism 8.0.1 program was used with the calculation of Student's t-test. **Results.** It has been established that new PTC are less toxic than fosenaazid. Behavioral testing showed that i.m. administration of T8 in test "OP" contributed to an increase in exploratory (6 and 12 mg/kg) and motor (12 mg/kg) activity, the development of an anxiolytic effect in the tests "EPM" (12 mg/kg) and "DLC" (6 mg / kg), and in "BD" (12 mg / kg) antidepressant effect. With the intravenous administration of T7, an increase in motor activity in the "OP" (16 mg / kg) was noted. **Conclusion.** Compounds of a number of PTC are promising for further synthesis and development as potential drugs with a different spectrum of psychotropic activity.s.

Keywords: phosphorylated thiosemicarbazides; open field; elevated plus maze; dark-light chamber; psychotropic properties

For citations:

Nikitina AV, Semina II, Nikitin DO, Gavrilova EL, Burangulova RN, Krutov IA, Isaeva AO. Experimental investigation of the behavioral effects of new phosphorylated thiosemicarbazides. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):68–76. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-68-76>

Received: 07.08.2023. Revision received: 15.08.2023. Accepted: 02.09.2023. Published: 30.09.2023.

Введение / Introduction

Простота и вариативность синтеза, а также широкий спектр биологической активности производных гидразина, таких как тиосемикарбазиды (ТСК) привлекает внимание исследователей [1]. Известно, что ТСК способны оказывать противоопухолевое, антибактериальное, противовирусное и противогрибковое действие, а также имеют антиоксидантные и антиатеросклеротические эффекты [2–7]. Кроме того, некоторые их производные применяются в качестве антикоррозионных агентов в аналитической химии и промышленности [8, 9]. Подобное разнообразие активности обусловлено их высокой способностью к диффузии через полупроницаемую мембрану клеток, а наличие нескольких реакционных центров позволяет данным структурам образовывать комплексы с катионами металлов, играющих значимую роль в метаболических процессах [10].

Интересно влияние ТСК на центральную нервную систему (ЦНС). Известно, что соединения данного класса, особенно при внедрении в их структуру триазолсодержащего фрагмента, угнетают активность глутаматдекарбоксилазы — фермента, отвечающего за регуляцию баланса возбуждающих (глутамат) и тормозных (гамма-аминомасляная кислота — ГАМК) нейромедиаторов, а возникающее при этом усиление глутаматергической иннервации в головном мозге способствует активизации процессов обучаемости и антидепрессивному действию [10–12].

Аналогичный широкий спектр активности отмечается и в группе фосфорилированных ацетогидразидов (ФАГ). Благодаря четырёхкоординированному атому фосфора в составе фосфорильного фрагмента, ФАГ удерживают несколько фармакофоров, каждый из которых способен оказывать воздействие на разные звенья патологического процесса, что открывает перед исследователями неограниченные возможности в разработке лекарственных средств нового поколения [13, 14]. Это положение было подтверждено при исследовании и внедрении в клиническую практику гидразида дифенилфосфорилуксусной кислоты — препарата фосеназида (дифенизид, фосфабензид, гидифен), обладающего транквилизирующими, антиалкогольными, антидепрессивными и противоэпилептическими свойствами. Известно, что фосеназид не вызывает нарушений памяти, что выгодно отличает его от транквилизаторов бензодиазепинового ряда и позволяет позиционировать его как «дневной» транквилизатор, с выраженной вегетотропной активностью, а также противоэпилептическим действием [14, 15]. Кроме того, препарат снимает симптоматику алкогольной абстиненции и нивелирует влечение к алкоголю, не вызывает усиления наркотического действия этанола [13]. В ходе клинического применения фосеназида был обнаружен антидепрессивный эффект и положительное влияние на состояние сердечно-сосуди-

стой системы, что обусловлено антиоксидантными свойствами, а также способностью восстанавливать функциональную активность клеточных мембран, при отсутствии влияния на активность синаптической ацетилхолинэстеразы [13–15].

Результаты изучения химических и фармакологических свойств фосеназида и других производных этого ряда были ключевыми для проведения систематических исследований фармакологической активности в указанном классе соединений с целью направленного создания новых лекарственных препаратов [14]. Перспективным вариантом в изучении и изыскании новых лекарственных средств, обладающих психотропной активностью может стать модификация ТСК фосфорсодержащим фрагментом.

Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение влияния фосфорилированных производных ТСК на когнитивные функции и поведенческие реакции лабораторных животных.

Материалы и методы / Materials and methods

Объектами исследования явились 2 синтезированных соединения ряда фосфорилированных ТСК. В качестве препарата сравнения использовали ближайший структурный аналог — гидразид дифенилфосфорилуксусной кислоты (Фосеназид) (рис. 1).

1) 2-[2-(Дифенилфосфорил)ацетил]гидразинкарботиоамид (шифр Т7);

2) 2-[(Дифенилфосфорил)ацетил]-N-фенилгидразин-1-карботиоамид (шифр Т8).

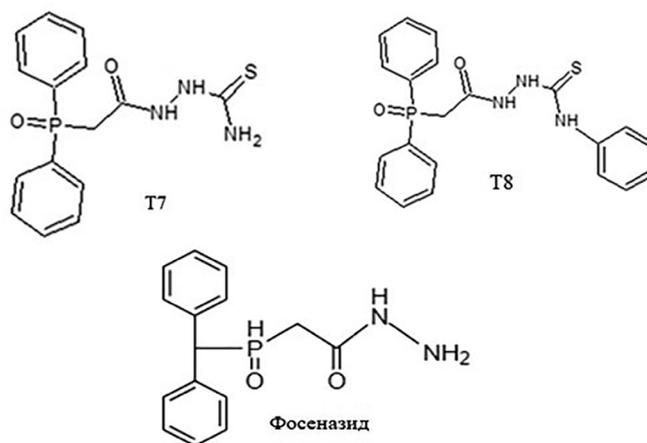


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых соединений
Fig. 1. Structural formulas of the studied compounds

Эксперименты проведены на 230 белых беспородных мышах-самцах массой 18–24 г. До начала исследования все животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной диете (ГОСТ Р 50258-92) с соблюдением международных рекоменда-

ций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997), а также согласно «Правила надлежащей лабораторной практики», утверждённых приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Все исследования были одобрены комитетом по этической экспертизе Казанского государственного медицинского университета Минздрава России (протокол № 10 от 19.12.2017).

Для оценки острой токсичности свежеприготовленные растворы Т7 и Т8 с эмульгатором Твин-80 в соответствующей дозе были введены путём внутривенных (в/в) инъекций 6 белым мышам-самцам, после чего определена максимально-толерантная, абсолютно-смертельная (LD_{100}) и средняя смертельная дозы (LD_{50}). Полученные экспериментальные данные были обработаны методом «накопления частот» по Беренсу, LD_{50} определяли графически, а её ошибку — по формуле Гэддама [16].

После определения острой токсичности проводили поведенческое тестирование на установках «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Тёмно-светлая камера» и «Поведенческое отчаяние», выбор которых проводился согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [16].

На данном этапе введение исследуемых соединений и препарата сравнения осуществляли путём в/в инъекций свежеприготовленных растворов с эмульгатором Твин-80 за 30 минут до начала тестирования в дозах, составляющих 1/100 и 1/50 от LD_{50} : Т7 (8 мг/кг и 16 мг/кг), Т8 (6 мг/кг и 12 мг/кг), Фосеназид (3 мг/кг и 6 мг/кг). Контрольным животным в/в был введён эквивалентный объём физиологического раствора с эмульгатором.

Методы поведенческого тестирования / Behavioral testing methods

1. Для изучения двигательной и исследовательской (ориентировочной) реакции животных использовали установку «Открытое поле» (НПК «Открытая наука», Россия) [17]. Установка представляет собой камеру круглой формы (диаметр 63 см) с непрозрачными стенками (высота стенок 32 см), пол которой расчерчен на сектора для удобства визуальной регистрации. Кроме того, в полу имеются отверстия, имитирующие норки (диаметр 1 см). Испытуемое животное помещалось в центр модели, после чего за 3 минуты тестирования регистрировали следующие параметры:

I) Количество пересечённых линий, что отражает неспецифический уровень возбуждения (двигательная активность). Критерием перехода из одного сектора в другой являлось нахождение задних лап в новом секторе.

II) Количество обследованных отверстий, что является показателем исследовательской активности [16, 18].

2. Для оценки анксиолитической активности соединений были использованы методики «Приподнятый крестообразный лабиринт» (НПК, «Открытая наука», Россия), а также «Тёмно-светлая камера» (НПК «Открытая наука», Россия).

A) Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) позиционируется как один из наиболее чувствительных тестов для исследования тревожного поведения животного [16]. Установка ПКЛ представляет собой объединение четырёх пластиковых отсеков, два из которых окружены с 3 сторон непрозрачными стенками и представляют собой «закрытые рукава» (ЗР). Два оставшихся не имеют стен, более ярко освещены (400 люкс) и являются «открытыми рукавами» (ОР) (длина каждого рукава — 30 см, высота стенок ЗР — 15 см, ширина — 5 см). Таким образом, ЗР являются аналогом норы, а ОР — потенциально опасной областью.

В ходе тестирования животное помещали в центр лабиринта, носом к ОР, позволяли исследовать модель в течение 5 минут и регистрировали время нахождения мышью в ОР (с) установки, что является показателем уровня тревожности. Критерием регистрации захождения в определённый отсек лабиринта, считалось наличие всех 4 лап животного внутри соответствующего рукава [19].

Б) Установка «Тёмно-светлая камера» (ТСК) считается аналогом методики ПКЛ и основана на стремлении мышью избегать ярко освещённых мест. Она представляет собой две одинаковые по размерам (20×20×20) сообщающиеся камеры — тёмную и светлую. Тёмная камера окрашена внутри в чёрный цвет, закрыта крышкой и является аналогом убежища для грызунов. Светлая камера окрашена в белый цвет, не имеет крышки, ярко освещена (400 люкс) и считается потенциально опасной областью.

При проведении тестирования исследуемое животное помещали в светлую камеру и в течение 5 минут регистрировали время нахождения в данном отсеке (с). Считается, что применение средств, обладающих анксиолитической активностью, увеличивает время нахождения в светлой части установки [16].

3. Для исследования антидепрессивных свойств соединений была использована установка «Поведенческое отчаяние» (ПО) (НПК «Открытая наука», Россия) [16]. Установка представляет собой прозрачный цилиндрический сосуд (высотой 30 см, диаметром 10 см), наполненный водой (15 см), температура которой — 21 °С. Данный тест основан на том, что мыши, принужденные плавать в ограниченном пространстве цилиндра, замирают. Считается, что замирание отражает состояние безысходности и уменьшается антидепрессантами. Таким образом, в данном тесте в течение 6 минут оценивали длительность периодов замирания животного (с) [20].

После тестирования каждого животного осуществляли дезодорацию установки с использованием 3 % перекиси водорода, а после каждой группы мышью поверхность обрабатывали 70 % раствором этанола.

Для оптимизации работы регистрация поведенческих реакций животных осуществлялась цифровой видеосистемой в компьютерной программе «EthovisionXT» (Noldus, Нидерланды), а показатели исследовательской активности животных в тесте «Открытое поле» оценивались при визуальном анализе видеофайлов в программе «RealTime» версии 1.15 (НПК «Открытая наука», Россия) [21].

Статистическая обработка результатов поведенческого тестирования проведена в программе GraphPadPrism8.0.1. с использованием t-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p < 0,05$. Результаты поведенческих тестов представлены графически в виде $M \pm SEM$, где M — среднее значение, SEM — стандартная ошибка среднего, p — уровень значимости.

Результаты / Results

1) Синтез производных ТСК

2-[2-(Дифенилфосфорил)ацетил]гидразинкарботиоамид (Т7) был синтезирован по реакции гидразида дифенилфосфорилуксусной кислоты и тиоцианата калия, а для синтеза 2-[2-(Дифенилфосфорил)ацетил]-N-фенилгидразинкарботиоамида (Т8) использовали фенилизотиоцианат.

Взаимодействие Фосеназида с тиоцианатом калия в водном растворе в присутствии соляной кислоты привело к образованию тиосемикарбазида (Т7) с выходом 84 %. В ЯМР ¹H спектре соединения Т7 наблюдали сигналы протонов группы РСН₂ в области 3,57 м.д., ароматические протоны проявлялись в области 7,54–7,80 м.д., сигналы групп NH наблюдались в виде синглетов в области 9,39 и 10,14 м.д., протонам NH₂ группы соответствовал дублетный сигнал 7,99 м.д. В ИК-спектре присутствовали валентные колебания групп Р = О (1165 см⁻¹), С = S (1268 см⁻¹), С = О (1701 см⁻¹), NH (3305, 3422 см⁻¹). Спектр ЯМР ³¹P 29,20 м. д.

Взаимодействие Фосеназида с фенилизотиоцианатом в этиловом спирте приводило к образованию тиосемикарбазида (Т8) с выходом 90 %. В ЯМР ¹H спектре соединения Т8 присутствовали сигналы протонов группы РСН₂ в области 3,68 м.д., ароматические протоны проявлялись в области 7,18–7,81 м.д., сигналы групп NH наблюдали в виде трёх синглетов в области 9,81; 10,10; 10,43 м.д. Спектр ЯМР ³¹P 29,89 м.д. Таким образом, данные элементного анализа подтверждают состав соединений Т7 и Т8.

Синтез новых фосфорилированных производных ТСК схематично представлен на рис. 2.

2) Исследование острой токсичности

Показатели LD₅₀ соединений при изучении острой токсичности при их в/б введении представлены в табл. 1.

Общая продолжительность наблюдения за животными после введения веществ составляла 3 дня. В первый день животные находились под наблюдени-

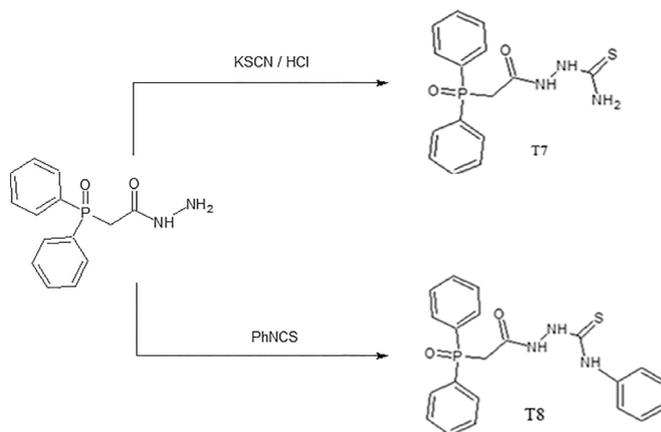


Рис. 2. Схема синтеза 2-[2-(Дифенилфосфорил)ацетил]гидразинкарботиоамида (Т7) и 2-[2-(Дифенилфосфорил)ацетил]-N-фенилгидразинкарботиоамида (Т8)
Fig. 2. Scheme for the synthesis of 2-[2-(Diphenylphosphoryl)acetyl]hydrazinecarbothioamide (T7) and 2-[2-(Diphenylphosphoryl)acetyl]-N-phenylhydrazinecarbothioamide (T8)

Таблица 1

Показатели острой токсичности производных тиосемикарбазидов и Фосеназида при внутрибрюшинном введении белым мышам-самцам

Table 1

Indicators of acute toxicity of thiosemicarbazide and Fosenazide derivatives during intraperitoneal administration to white male mice

№	Соединение	Средняя смертельная доза LD ₅₀ (мг/кг)
1	Т7	810±30
2	Т8	615±24
3	Фосеназид	315 ±35

ем в течение 6 часов. На протяжении всего периода наблюдений внешний вид и поведение животных не отличались от таковых у мышей контрольной группы.

Результаты, полученные при исследовании острой токсичности, позволяют отнести соединения Т7 и Т8 к «относительно безвредным», или «малотоксичным», согласно «Классификации токсичности веществ при введении под кожу и в брюшную полость животного» [22]. При сравнительной оценке исследуемых соединений с Фосеназидом, установлено, что они обладают более низкой токсичностью, а наименее токсичным является соединение Т7 (см. табл. 1).

После исследования острой токсичности соединений было проведено поведенческое тестирование.

3) Результаты поведенческого тестирования

Результаты изучения поведенческих реакций мышей на модели «Открытое поле» представлены на рис. 3.

В ходе исследования установлено, что введение мышам соединения Т8 в дозе 12 мг/кг и Фосеназида (3 мг/кг) способствовало увеличению двигательной активности, что выражалось в повышении числа пере-

сечённых линий в 1,4 ($p < 0,05$) и 1,3 ($p < 0,05$) раза, соответственно, по сравнению с контрольными животными. Введение Т7 в дозе 16 мг/кг характеризовалось снижением данного показателя в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными мышами (рис. 3А).

Анализ исследовательской активности животных показал, что применение Т8 в обеих дозах увеличивает (в 1,5 раза ($p < 0,05$)) количество обследованных отверстий, а введение Т7 в дозе 16 мг/кг статистически значимо снижало количество обследованных отвер-

стей в 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с животными контрольной группы (рис. 3Б). В остальных группах статистически значимых отличий не выявлено.

Поскольку для Фосеназида и других производных дифенилфосфорилуксусной кислоты характерно наличие транквилизирующих (анксиолитических) свойств, нами была проведена оценка влияния новых фосфорилированных тиосемикарбазидов на состояние тревожности мышей в тестах ПКЛ и ТСК. Результаты представлены на рис. 4 и 5.

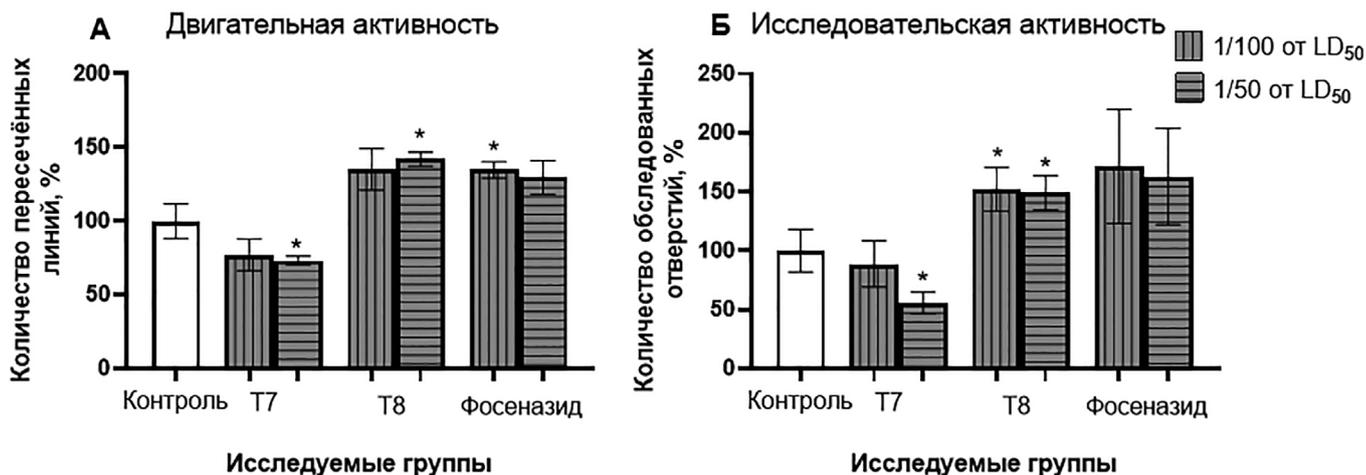


Рис. 3. Влияние фосфорилированных тиосемикарбазидов на двигательную (А) и исследовательскую (Б) активность мышей в тесте «Открытое поле»

Fig. 3. Effect of phosphorylated thiosemicarbazides on motor (A) and exploratory (B) activity of mice in the «Open Field» test
 Примечания: по оси абсцисс исследуемый показатель (%); по оси ординат — группы животных; * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы контроля.

Notes: on the abscissa axis, the studied indicator (%); on the ordinate axis — groups of animals; * ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the control group.

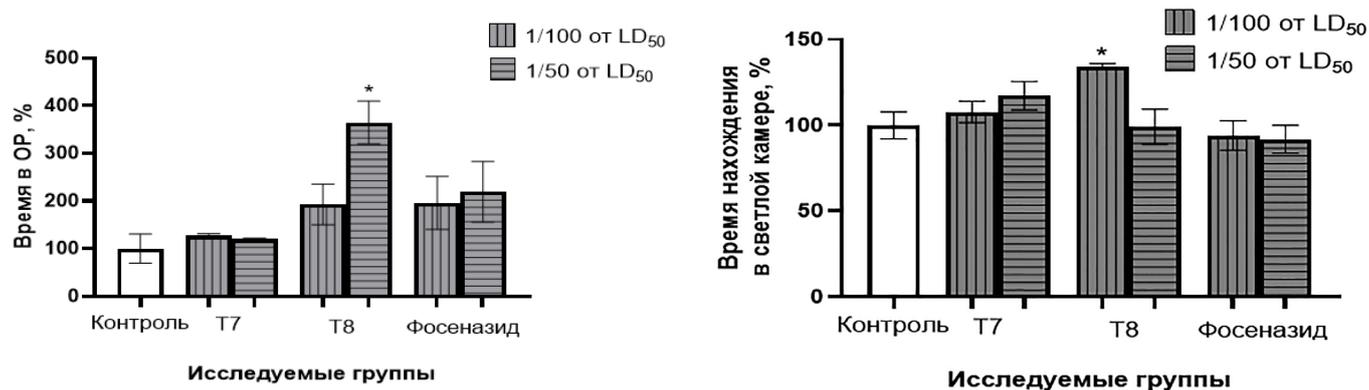


Рис. 4. Влияние фосфорилированных тиосемикарбазидов на время пребывания мышей в открытых рукавах (ОР) теста «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Fig. 4. Effect of phosphorylated thiosemicarbazides on the residence time of mice in the open arms (OR) of the «Elevated Plus Maze» test
 Примечания: по оси абсцисс — время нахождения в «открытых рукавах» (%); по оси ординат — группы животных; * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы контроля.

Notes: on the abscissa axis — the time spent in the "open sleeves" (%); on the ordinate axis — groups of animals; * ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the control group.

Рис. 5. Влияние фосфорилированных тиосемикарбазидов на время нахождения мышей в светлом отсеке теста «Тёмно-светлая камера»

Fig. 5. Effect of phosphorylated thiosemicarbazides on the time spent by mice in the light section of the «Dark-Light Chamber» test

Примечания: по оси абсцисс — время пребывания в светлом отсеке камеры (%); по оси ординат — группы животных; * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы контроля.
 Notes: on the abscissa axis — the time spent in the light compartment of the camera (%); on the ordinate axis — groups of animals; * ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the control group.

В тесте ПКЛ установлено, что поведение мышей, получавших соединение Т8 в дозе 12 мг/кг характеризовалось пониженным уровнем тревожности, который выражался в увеличении времени пребывания в ОР модели в 3,7 раз ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными. В остальных группах статистически значимых отличий не выявлено (см. рис. 4).

В ходе тестирования на установке ТСК было показано, что введение соединения Т8 в дозе 6 мг/кг приводило к увеличению времени пребывания в светлой камере в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными мышами, т. е. анксиолитическому действию. В остальных группах статистически значимых различий не обнаружено см. рис. 5).

Для выявления антидепрессивных свойств производных ФТК применяли тест ПО. В ходе исследования установлено, что введение Т8 в дозе 12 мг/кг уменьшает продолжительность времени замирания животных в 2,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, т. е. способствует развитию антидепрессивного эффекта (рис. 6.).

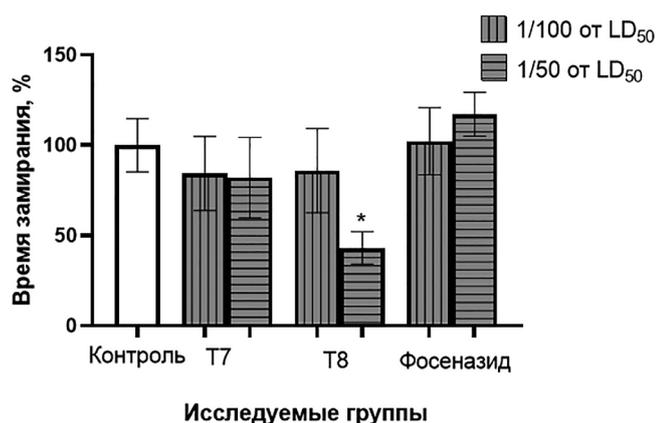


Рис. 6. Влияние фосфорилированных тиосемикарбазидов на время замирания мышей в тесте «Поведенческое отчаяние»

Fig. 6. Effect of phosphorylated thiosemicarbazides on the freezing time of mice in the «Behavioral Despair» test

Примечания: по оси абсцисс — время замирания животных (%); по оси ординат — группы животных; * ($p < 0,05$) — статистически значимые различия по отношению к показателям группы контроля.

Notes: on the abscissa axis — the fading time of animals (%); on the ordinate axis — groups of animals; * ($p < 0.05$) — statistically significant differences in relation to the indicators of the control group.

Обсуждение / Discussion

Данные литературы свидетельствуют о том, что лечение заболеваний ЦНС требует комплексного подхода в фармакологической коррекции [23, 24]. Ранее было показано, что ФАГ, имея в своей структуре четырёхкоординированный атом фосфора с различными функциональными группами, могут обеспечивать мультитаргетный механизм действия,

а модификации их структуры способны привести к изменению различных видов психотропной активности [13–15]. Не меньший интерес вызывает класс ТСК, обусловленный наличием нескольких реакционных центров и доступностью формирования различных N-, S-содержащих гетероциклических систем на их основе, а также широким спектром биологической активности данных структур [1–10].

В исследовании приводится описание синтеза новых производных ФТК (Т7 и Т8), изучена острая токсичность при в/б введении, а также влияние на поведение мышей в сравнении с их структурным аналогом — дифенилфосфорилацетогидразидом (фосеназидом).

При изучении острой токсичности соединений Т7 и Т8 при в/б введении выявлено, что они обладают более высоким профилем безопасности по сравнению с фосеназидом. Следует отметить, что наименьшие показатели токсичности отмечены у структуры Т7, что предположительно связано с наличием фенильного элемента в тиосемикарбазидной группе.

Для изучения влияния ФТК на поведение применяли модели «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Тёмно-светлая камера» и «Поведенческое отчаяние» [16].

Установка «Открытое поле» позволяет оценить влияние соединений на двигательную и исследовательскую активность, то есть формы поведения, естественные для грызунов [16, 17]. Установлено, что в/б введение ФТК характеризуется разнонаправленными эффектами: в случае соединения Т7 в дозе 16 мг/кг наблюдалось снижение двигательной и исследовательской активности мышей, что можно расценивать как угнетение функций ЦНС, а применение Т8 сопровождалось активизацией как двигательных (в дозе 6 мг/кг), так и исследовательских форм поведения (в обеих дозах), что может объясняться различием в структурах. Следует отметить, что при введении фосеназида в дозе 3 мг/кг наблюдалось повышение двигательной активности.

Известно, что производные дифенилфосфорилак-сусной кислоты способны проявлять анксиолитический эффект, для изучения которых были использованы тесты «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Тёмно-светлая камера» — общепринятые подходы для изучения подобного поведения [16]. Наиболее выраженное анксиолитическое действие при данном режиме введения, превосходящее как показатели контрольной группы, так и группы, получавшей препарат сравнения, наблюдалось в случае применения N-фенилзамещённого тиосемикарбазид (Т8): в дозе 12 мг/кг данный эффект наблюдался в тесте ПКЛ, а в дозе 6 мг/кг — в тесте ТСК.

Учитывая, что в литературе представлены данные о наличии некоторых антидепрессивных свойств у соединений с триазолсодержащими системами в структуре был выполнен тест на установке «Поведен-

ческое отчаяние» [13–15]. Тестирование показало, что наибольший антидепрессивный эффект был отмечен при введении животным соединения Т8 в дозе 12 мг/кг, что выражалось в сокращении продолжительности замиранья мышей. При введении фосеназида, а также Т7 вышеуказанного эффекта не наблюдалось, что может быть связано с отсутствием N-фенилзамещённого фармакофора в тиосемикарбазидной структуре.

Таким образом, новые производные ФТК менее токсичны по сравнению с их структурным аналогом фосеназидом, а самым безопасным является соединение Т7, не содержащее фенилфенильный радикал в тиосемикарбазидной структуре. Последующее изучение психотропной активности показало перспективность соединения N-фенилзамещённого тиосемикарбазида (Т8), обладающего выраженными анксиолитическими, антидепрессивными свойствами, а также активизирующее двигательные формы поведения.

Выводы / Conclusions

1) Соединение Т7 обладает более высоким профилем безопасности, что может быть связано с замещением в гидразидной группе дифенилфосфорилюксусной кислоты тиосемикарбазидным фрагментом.

2) Соединение N-фенилзамещённого тиосемикарбазида (Т8) в эксперименте демонстрирует анксиолитическое и антидепрессивное действие, превосходящее эффект структурного аналога — фосеназида.

3) Соединения ряда фосфорилированных производных тиосемикарбазидов являются перспективными для дальнейшего синтеза и разработки в качестве по-

тенциальных лекарственных препаратов, обладающих мультитаргетной психотропной активностью.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

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

Участие авторов. *Никитина А. В.* — проведение поведенческих экспериментов, обработка полученных результатов, написание текста статьи; *Семина И. И.* — концепция и дизайн исследования, общий анализ полученных данных, консультация при написании текста; *Никитин Д. О.* — проведение поведенческих экспериментов и обработка полученных результатов; *Гаврилова Е. Л.* — обзор литературы, постановка синтеза соединений; *Бурангулова Р. Н.* — постановка синтеза, интерпретация результатов; *Крутов И. А.* — выполнение синтеза, интерпретация результатов; *Исаева А. О.* — выполнение синтеза.

Participation of authors. *Nikitina AV* — conducting behavioral experiments, processing the results obtained, writing the text of the article; *Semina II* — concept and design of the study, general analysis of the data obtained, consultation when writing the text; *Nikitin DO* — conducting behavioral experiments and processing the results obtained; *Gavrilova EL* — literature review, formulation of synthesis of compounds; *Burangulova RN* — synthesis formulation, interpretation of results; *Krutov IA* — synthesis execution, interpretation of results; *Isaeva AO* — synthesis execution.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Никитина Анастасия Вадимовна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: namovol@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6219-6246>

Ассистент кафедры фармакологии, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Российская Федерация

Anastasiya V. Nikitina

Corresponding author

e-mail: namovol@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6219-6246>

Assistant of the Department of Pharmacology, FSBEI HE Kazan SMU MOH Russia, Kazan, Russian Federation

Семина Ирина Ивановна

e-mail: semina@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>

д. м. н., профессор кафедры фармакологии, заведующая Центральной научно-исследовательской лабораторией, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Российская Федерация

Irina I. Semina

e-mail: semina@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>

Dr. Sci (Med.), Professor of the Department of Pharmacology, Head of the Central Research Laboratory, FSBEI HE Kazan SMU MOH Russia, Kazan, Russian Federation

Никитин Дмитрий Олегович

e-mail: richard4777@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-867X>
 Ассистент кафедры фармакологии, ФГБОУ ВО
 Казанский ГМУ Минздрава России, Казань,
 Российская Федерация

Dmitry O. Nikitin

e-mail: richard4777@yandex.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-867X>
 Assistant of the Department of Pharmacology,
 FSBEI HE Kazan SMU MOH Russia, Kazan,
 Russian Federation

Гаврилова Елена Леонидовна

e-mail: gavrilova_elena_@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8093-7095>
 Заведующая кафедрой органической химии
 имени академика А.Е. Арбузова, ФГБОУ ВО
 «КНИТУ», Казань, Российская Федерация

Elena L. Gavrilova

e-mail: gavrilova_elena_@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8093-7095>
 Head of the Department of Organic Chemistry
 named after academician AE Arbuzov, KNRTU,
 Kazan, Russian Federation

Бурангулова Рамиля Нурлыгаяновна

e-mail: rburangulova@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1426-0722>
 к. х. н., доцент кафедры органической химии
 имени академика А.Е. Арбузова, ФГБОУ ВО
 «КНИТУ», Казань, Российская Федерация

Ramilya N. Burangulova

e-mail: rburangulova@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1426-0722>
 PhD, Cand. Sci. (Chemical), Associate Professor of
 the Department of Organic Chemistry named after
 academician AE Arbuzov, KNRTU, Kazan, Russian
 Federation

Крутов Иван Алексеевич

e-mail: rburangulova@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1426-0722>
 к. х. н., доцент кафедры органической химии
 имени академика А.Е. Арбузова, ФГБОУ ВО
 «КНИТУ», Казань, Российская Федерация

Ivan A. Krutov

e-mail: cat_the_chemist@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8507-1785>
 PhD, Cand. Sci. (Chemical) of the Department of
 Organic Chemistry named after academician
 AE Arbuzov, KNRTU, Kazan, Russian Federation

Исаева Анастасия Олеговна

e-mail: tasaisaeva@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3330-9157>
 Заведующая комплексной лабораторией
 «Структура и состав органических веществ»,
 ФГБОУ ВО «КНИТУ», Казань, Российская
 Федерация

Anastasia O. Isaeva

e-mail: tasaisaeva@gmail.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3330-9157>
 Head of the complex laboratory "Structure and
 composition of organic substances", KNRTU,
 Kazan, Russian Federation

Список литературы / References

1. Gopalakrishnan M, Sureshkumar P, Thanusu J, Kanagarajan V. Unusual formation of N-hydroxy-3,3-dimethyl-2,6-diarylpiperidin-4-one and its thiosemicarbazide derivative—synthesis and antimicrobial activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008;42(5):271–276. DOI: 10.1007/s11094-008-0104-z.
2. Banerjee D, Yogeewari P, Bhat P, et al. Novel isatinyl thiosemicarbazones derivatives as potential molecule to combat HIV-TB co-infection. *Eur J Med Chem*. 2011 Jan;46(1):106–121. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.10.020.
3. Siddiqui N, Singh O. Antibacterial activity of some 4-N-substituted thiosemicarbazides and thiosemicarbazones. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003;65 (4):423–425.
4. Majumdar P, Pati A, Patra M, et al. Acid hydrazides, potent reagents for synthesis of oxygen-, nitrogen-, and/or sulfur-containing heterocyclic rings. *Chem Rev*. 2014 Mar 12;114(5):2942–2977. DOI: 10.1021/cr300122t.

5. Siwek A, Stefańska J, Dzitko K, Ruszczak A. Antifungal effect of 4-arylthiosemicarbazides against *Candida* species. Search for molecular basis of antifungal activity of thiosemicarbazide derivatives. *J Mol Model*. 2012 Sep;18(9):4159–4170. DOI: 10.1007/s00894-012-1420-5.
6. Thomas AM, Naik AD, Nethaji M, Chakravarty AR. Synthesis, crystal structure and photo-induced DNA cleavage activity of ternary copper(II) – thiosemicarbazone complexes having heterocyclic bases. *Inorganica Chimica Acta*. 2004;357:2315–2323. DOI: 10.1016/j.ica.2004.01.031.
7. Seleem HS, El-Shetary BA, Khalil SME, et al. Structural diversity in copper(II) complexes of bis(thiosemicarbazone) and bis(semicarbazone) ligands. *Journal of Coordination Chemistry*. 2005;58:479–493. DOI: 10.1080/00958970512331334269.
8. Reis CM, Pereira DS, Paiva Rde O, et al. Microwave-assisted synthesis of new N1,N4-substituted thiosemicarbazones. *Molecules*. 2011 Dec 20;16(12):10668–10684. DOI: 10.3390/molecules161210668.
9. Plech T, Wujec M, Siwek A, Kosikowska U, Malm A. Synthesis and antimicrobial activity of thiosemicarbazides, s-triazoles and their Mannich

bases bearing 3-chlorophenyl moiety. *Eur J Med Chem.* 2011 Jan;46(1): 241–248. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.11.010.

10. Газиева Г.А., Кравченко А.Н. Тиосемикарбазиды в синтезе пяти- и шестичленных гетероциклических соединений. *Успехи химии.* 2012;81(6):494–523. [Gazieva GA, Kravchenko AN. Thiosemicarbazides in the synthesis of five- and six-membered heterocyclic compounds. *Russ Chem Rev.* 2012;81(6):494–523. (In Russ.)]. DOI: 10.1070/RC2012v081n06ABEH004235.

11. Hisle-Gorman E, Susi A, Stokes T, et al. Prenatal, perinatal, and neonatal risk factors of autism spectrum disorder. *Pediatric research.* 2018;84(2):190–198. DOI: 10.1038/pr.2018.23.

12. Varvaresou A, Siatra-Papastaikoudi T, Dalla Tsotinis A, et al. Synthesis, lipophilicity and biological evaluation of indole-containing derivatives of 1,3,4-thiadiazole and 1,2, 4-triazole. *Farmaco.* 1998 May 30;53(5):320–326. DOI: 10.1016/s0014-827x(98)00024-x.

13. Никитин Д.О., Плотникова А.В., Галимова Л.Ф. и др. Исследование психотропных свойств новых аналогов транквилизатора фосеназида. *Современные проблемы науки и образования.* 2016;(6):138–138. [Nikitin DO, Plotnikova AV, Galimova LF, et al, A study of psychotropic properties of the new analogues of tranquilizer phosenezid. *Modern problems of science and education.* 2016;(6):138–138. (In Russ.)]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25696>

14. Семина И.И., Байчурина А.З. Разработка новых потенциальных лекарственных средств с психотропной активностью среди фосфорилацетогидразидов и других производных фосфорилированных карбоновых кислот — приоритетное направление казанской школы психофармакологов. *Казанский медицинский журнал.* 2016;97(1):148–155. [Semina II, Baychurina AZ. Development of new potential drugs with psychotropic activity among phosphorylacetohydrazides and other phosphorylated carboxylic acids derivatives — priority area of Kazan school of psychopharmacologists. *Kazan Medical Journal.* 2016;97(1):148–155. (In Russ.)]. DOI: 10.17750/KMJ2016-148.

15. Семина И.И., Шиловская Е.В., Тарасова Р.И. и др. Механизмы психотропного действия гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот. *Химико-фармацевтический журнал.* 2002;36(4):3–6. [Semina II, Shilovskaya EV, Tarasova RI, et al. Mekhanizmy psihotropnogo dejstviya gidrazidov fosforilirovannyh karbonovyh kislot. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2002;36(4):3–6. (In Russ.)]. DOI: 10.30906/0023-1134-2002-36-4-3-6.

16. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1 / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К; 2012. [Mironov AN,

Bunyatyan ND, Vasiliev AN, et al. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1 / Ed by AN Mironova. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ.)].

17. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 2015 Feb 6;(96):e52434. DOI: 10.3791/52434.

18. Martin-Arenas FJ, Pintado CO. Results of the Open Field Test at different light intensities in C57 mice. *Proceedings of Measuring Behavior.* 2014;1-5. DOI: 10.13140/RG.2.2.29920.74247.

19. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.

20. Гарибова Т.Л., Крайнева В.А., Воронина Т.А. Поведенческие экспериментальные модели депрессии. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2017;(3):14–19. [Garibova TL, Kraineva VA, Voronina TA. Animal models of depression. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2017;(3):14–19. (In Russ.)].

21. Sabatos-DeVito M, Murias M, Dawson G, et al. Methodological considerations in the use of Noldus EthoVision XT video tracking of children with autism in multi-site studies. *Biol Psychol.* 2019 Sep;146:107712. DOI: 10.1016/j.biopsycho.2019.05.012.

22. Березовская И. В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал.* 2003;37(3):32–34. [Berezovskaya IV. Classification of chemicals according to the parameters of acute toxicity in parenteral administration. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2003;37(3):32–34. (In Russ.)]. DOI: 10.30906/0023-1134-2003-37-3-32-34.

23. Васенина Е.Е., Левин О.С., Сонин А.Г. Современные тенденции в эпидемиологии деменции и ведении пациентов с когнитивными нарушениями. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2017;117(6 2):87–95. [Vasenina EE, Levin OS, Sonin AG. Modern trends in epidemiology of dementia and management of patients with cognitive impairment. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2017;117(6 2):87–95. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/jnevro20171176287-95.

24. Науменко А.А., Громова Д.О., Трофимова Н.В., Преображенская И.А. Диагностика и лечение болезни Альцгеймера. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2016;8(4):91–97. [Naumenko AA, Gromova DO, Trofimova NV, Preobrazhenskaya IS. Alzheimer's disease: diagnosis and treatment. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics.* 2016;8(4):91–97. (In Russ.)]. doi: 10.14412/2074-2711-2016-4-91-97.

Антидепрессивная активность производного пиррола [1,2a][1,4] диазефина ГМАЛ-24 в тесте вынужденного плавания у мышей

© Королев А. О., Волкова А. В., Козин Я. С., Мокров Г. В., Воронина Т. А., Калинина Т. С.

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

Аннотация. Изучена антидепрессивная активность синтезированных в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» производных пирроло[1,2a][1,4] диазепинов (ГМАЛ-24, ГМАЛ-27, ГМАЛ-31, ГМАЛ-32 и ГМАЛ-33) в тесте вынужденного плавания на самцах беспородных мышей. Соединения тестировали в диапазоне доз от 1,5 мг/кг до 20 мг/кг, группа сравнения получала трициклический антидепрессант амитриптилин в дозе 10 мг/кг, контрольная группа получала 0,5 мл физиологического раствора. Все инъекции проводились внутривенно. При введении ГМАЛ-27 наблюдали снижение времени иммобилизации в 1,78; 1,64 и 1,74 раз, соответственно, по сравнению с контролем во всех трёх изученных дозах (1,5 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг), без значимых отличий от контроля ($p = 0,1340$; $p = 0,2748$; $p = 0,2214$, соответственно). Соединение ГМАЛ-31 в дозах от 1,5 мг/кг до 20 мг/кг не оказывало влияния на длительность иммобилизации по сравнению с контрольной группой мышей. Установлено, что соединение ГМАЛ-24 в дозах 5 мг/кг и 10 мг/кг достоверно уменьшал периоды иммобилизации по сравнению с группой контроля и не отличался по данному параметру от препарата сравнения, что указывает на антидепрессивный эффект, сопоставимый с действием амитриптилина.

Ключевые слова: вынужденное плавание; антидепрессивный эффект; беспородные мыши

Для цитирования:

Королев А. О., Волкова А. В., Козин Я. С., Мокров Г. В., Воронина Т. А., Калинина Т. С. Антидепрессивная активность производного пиррола[1,2a][1,4] диазефина ГМАЛ-24 в тесте вынужденного плавания у мышей. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):77–81. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-77-81>

Поступила: 16.08.2023. **В доработанном виде:** 23.08.2023. **Принята к печати:** 07.09.2023. **Опубликована:** 30.09.2023.

Antidepressant activity of the pyrrolo[1,2a][1,4]diazepine GMAL-24 in a forced swimming test in mice

© Anton O. Korolev, Anna V. Volkova, Yaroslav S. Kozin, Grigory V. Mokrov, Tatiana A. Voronina, Tatiana S. Kalinina

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

Abstract. The antidepressant activity of pyrrolo[1,2a][1,4]diazepines (GMAL-24, GMAL-27, GMAL-31, GMAL-32 and GMAL-33) synthesized at the V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology in a forced swimming test on male outbred mice was studied. The compounds were tested in the dose range from 1.5 mg/kg to 20 mg/kg, the reference group received tricyclic antidepressant amitriptyline at a dose of 10 mg/kg, and the control group received 0.5 ml of saline solution. All injections were performed intraperitoneally. After GMAL-27 administration immobilization time was decreased of 1.78, 1.64 and 1.74 times, respectively, compared with the control in all three studied doses (1.5 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg), without significant differences from the control ($p = 0.1340$; $p = 0.2748$; $p = 0.2214$, respectively). The compound GMAL-31 in doses from 1.5 mg/kg to 20 mg/kg had no effect on the duration of immobilization compared to the control group of mice. It was established that the compound GMAL-24 at doses of 5 mg/kg and 10 mg/kg significantly reduced the periods of immobilization compared to the control group and did not differ in this parameter from the comparison drug, which indicates an antidepressant effect comparable to the effect of amitriptyline.

Keywords: forced swimming test; antidepressive effect; white outbred mice

For citations:

Korolev AO, Volkova AV, Kozin YS, Mokrov GV, Voronina TA, Kalinina TS. Antidepressant activity of the pyrrolo[1,2a][1,4]diazepine GMAL-24 in a forced swimming test in mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):77–81. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-77-81>

Received: 16.08.2023. **Revision received:** 23.08.2023. **Accepted:** 07.09.2023. **Published:** 30.09.2023.

Введение / Introduction

Депрессивные и тревожные расстройства в настоящее время представляют собой серьёзную угрозу работоспособности и качества жизни как индивидуально человеку, так и обществу в целом [1]. Среди множества нерешённых проблем терапии аффективных расстройств можно выделить несколько основных: отсроченное во времени наступление терапевтического эффекта, нежелательные лекарственные реакции, влияющие на качество жизни и состояние и, как следствие, низкая приверженность к лечению [2].

Одним из направлений при разработке новых антидепрессивных средств является поиск оригинальных

соединений, обладающих широким спектром психотропной активности при адекватном профиле безопасности. Перспективными соединениями, обладающими антидепрессивными и анксиолитическими эффектами является группа конденсированных производных пиррола. Ранее было установлено, что производные пирроло[1,2a]пиразина обладают анксиолитическим эффектом, а некоторые соединения обладают как анксиолитической, так и антидепрессивной активностью. Значительным плюсом является низкая токсичность соединений и относительно умеренные побочные проявления, присущие анксиолитикам [3]. Следующим этапом стал синтез и изучение ближайших аналогов пирроло[1,2a]пиразина — производных пирроло[1,2a]

[1,4]дiazепина. Известно, что производные 1,4-дiazепина имеют большое значение для медицинской практики благодаря широкому диапазону биологической активности, включающей антипсихотические, анксиолитические, глистогонные, противосудорожные, антибактериальные, противогрибковые и противораковые свойства [4]. Согласно экспериментальным данным, производные пирроло[1,2a][1,4]дiazепина обладают психотропными свойствами [5]. Ранее установлено, что 2-(2-гидроксиэтил)-1,2,4,5-тетрагидро-3H-пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-3-он (ГМАЛ-24) обладает выраженной антидепрессивной активностью в тесте Nomura на крысах, но не в тесте вынужденного плавания по Порсолту при использовании данного вида грызунов [5]. Имеются данные о различиях в фармакологических эффектах веществ на крысах и мышах [6, 7].

Целью данной работы является изучение антидепрессивного эффекта новых производных пирроло[1,2a][1,4]дiazепина — ГМАЛ-24, ГМАЛ-27, ГМАЛ-31, ГМАЛ-32 и ГМАЛ-33 (табл. 1) у мышей.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные / Animals. Опыты проведены на 100 самцах беспородных мышей массой 20–25 г. Животных содержали в стандартных условиях при световом цикле

«день–ночь» 12/12 ч с неограниченным доступом к воде и стандартному гранулированному корму. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики и Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». При проведении экспериментов были приняты меры, исключающие излишние физические страдания или повреждения животных.

Вещества / Substances. Оригинальные соединения, синтезированные в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», растворяли либо в воде для инъекций, либо диспергировали при использовании Твин-80 и готовили раствор для введения в дозах, указанных в табл. 2. Амитриптилин (раствор для внутривенного введения, Московский эндокринный завод) применяли в дозе 10 мг/кг. Инъекции всех тестируемых препаратов осуществляли внутрибрюшинно.

Методы / Methods. Используемая модификация метода вынужденного плавания состояла из 2 последовательных экспериментальных сеансов [8]. В 1-й день животных помещали в ёмкость с водой на 10 мин, после чего мышей возвращали в клетки постоянного содержания. Во 2-ой день (через 24 ч после первого сеанса) мышам вводили исследуемые соединения или контрольный раствор и через 40 мин помещали в ёмкости с водой на 5 мин, в течение которых осуществляли

Таблица 1

Физико-химические характеристики производных пирроло[1,2a][1,4]дiazепинов

Table 1

Physical and chemical characteristics of the pyrrolo[1,2a][1,4]diazepines

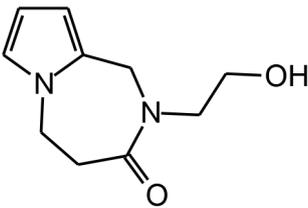
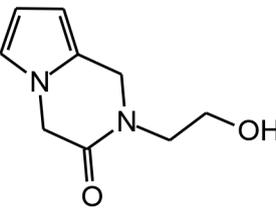
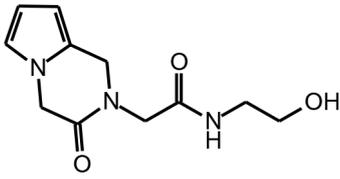
Формула	Молекулярная формула	Химическое название	Шифр	Растворимость в воде
	$C_{10}H_{14}N_2O_2$	2-(2-гидроксиэтил)-1,2,4,5-тетрагидро-3H-пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-3-он	ГМАЛ-24	+
	$C_9H_{12}N_2O_2$	2-(2-гидроксиэтил)-1,2-дигидропирроло[1,2-a]пиазин-3(4H)-он	ГМАЛ-27	+
	$C_{11}H_{15}N_3O_3$	N-(2-гидроксиэтил)-2-(3-оксо-3,4-дигидропирроло[1,2-a]пиазин-2(1H)-ил)ацетамид	ГМАЛ-31	+

Таблица 2

Результаты теста вынужденного плавания на мышах

Table 2

Forced swimming test results in mice

Группа	Количество животных	Доза, мг/кг, в/б	Время неподвижности, (с)
Контроль	10	—	184,7±11,70
Амитриптилин	10	10,00	43,77±11,20*
ГМАЛ-24	10	1,5	125,6±16,53
ГМАЛ-24	10	5	96,18±26,04*
ГМАЛ-24	10	10	70,57±22,59*
ГМАЛ-27	7	1,5	103,4±31,77
ГМАЛ-27	7	5	112,5±21,55
ГМАЛ-27	6	10	106,0±36,75
ГМАЛ-31	10	1,5	211,1±15,31
ГМАЛ-31	10	10	195,4±6,60
ГМАЛ-31	10	20	201,0±5,81

Примечание: * — $p < 0,05$.
Note: * — $p < 0,05$.

видеорегистрацию поведенческих реакций для последующей обработки. В опытах использовали цилиндры из прозрачного пластика диаметром 100 мм и высотой 300 мм. Объём воды подбирали так, чтобы животное не имело возможности ни выбраться, ни закрепиться хвостом за дно. Температуру воды поддерживали на уровне 23–25 °С, смену воды проводили после каждой группы животных. Экспериментальные группы состояли из 10 животных, видеозапись поведения в тестовый день велась одновременно в 5 цилиндрах. В ходе обработки эксперимента регистрировали периоды иммобилизации (с). Иммобилизацией считали отсутствие активности или дрейфующие движения животного, направленные на поддержание головы над поверхностью воды.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу GraphPad Prism. Проверку на нормальное распределение осуществляли по тесту Д'Агостино–Пирсона, данные представлены в виде средних значений с указанием стандартной ошибки среднего. Достоверность различий между группами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим сравнением между группами по критерию Тьюки. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты / Results

При введении соединения ГМАЛ-27 наблюдали снижение времени иммобилизации в 1,78; 1,64 и 1,74 раз, соответственно, по сравнению с контро-

лем во всех трёх изученных дозах (1,5 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг), без значимых отличий от контроля ($p = 0,1340$; $p = 0,2748$; $p = 0,2214$, соответственно). Соединение ГМАЛ-31 в дозах от 1,5 мг/кг до 20 мг/кг не оказывало влияния на длительность иммобилизации по сравнению с группой контрольных мышей. При введении соединения ГМАЛ-24 регистрировали дозозависимое снижение времени неподвижности с максимальным эффектом в дозе 10 мг/кг ($70,57 \pm 22,59$ с), по сравнению с контролем ($184,7 \pm 11,70$; $p = 0,0008$); в дозе 5 мг/кг наблюдали достоверное снижение времени неподвижности по сравнению с контролем ($96,18 \pm 26,04$ с). В эффективной дозе соединение ГМАЛ-24 по своему эффекту не отличалось от амитриптилина ($p = 0,9978$). Таким образом, было установлено, что из всех изученных производных пирроло[1,2a][1,4]дiazепина только 2-(2-гидроксиэтил)-1,2,4,5-тетрагидро-3H-пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-3-он обладает антидепрессивной активностью у мышей (см. табл. 2).

Заключение / Conclusion

Полученные результаты согласуются с данными о наличии у соединения ГМАЛ-24 антидепрессивной активности у крыс в тесте Nomura [3]. В тесте конфликтной ситуации при однократном введении анксиолитический эффект у ГМАЛ-24 не был выявлен [5], однако в тестах открытого поля и теста закапывания шариков ГМАЛ-24 в дозе 10 мг/кг проявлял анксиолитический и антикомпульсивный эффекты после субхронического введения на модели непредсказуемого хронического умеренного стресса [9]. Полученные результаты и данные других исследований ГМАЛ-24 позволяют предполагать его потенциал в клинической практике лечения аффективных расстройств.

Вывод / Conclusion

Установлено, что ГМАЛ-24 (5 и 10 мг/кг, в/б) обладает антидепрессивным эффектом, сопоставимым с амитриптилином, в тесте «Вынужденное плавание» у мышей.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. При подготовке данной статьи конфликт интересов не возникал.

Conflict of interest. There was no conflict of interest during the preparation of this article.

Участие авторов. Королев А. О. — разработка модели, проведение поведенческих опытов, анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование текста; Волкова А. В. — разработка модели, проведение поведенческих опытов, редактирование текста;

Козин Я. С. — анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование текста; Мокров Г. В. — синтез и изучение исследуемых соединений, интерпретация результатов, редактирование текста; Воронина Т. А. — разработка модели, анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование текста, утверждение рукописи; Калинина Т. С. — разработка модели, анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование текста.

Participation of authors. *Korolev AO* — model development, conducting behavioral experiments,

analysis and interpretation of results, writing and editing text; *Volkova AV* — model development, conducting behavioral experiments, text editing; *Kozin YS* — analysis and interpretation of results, writing and editing of text; *Mokrov GV* — synthesis and study of the studied compounds, interpretation of the results, text editing; *Voronina TA* — model development, analysis and interpretation of the results, writing and editing of the text, approval of the manuscript; *Kalinina TS* — model development, analysis and interpretation of the results, writing and editing of the text.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Королев Антон Олегович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: tony.korolev@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-1952-2238>

SPIN-код: 8701-6779

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

Anton O. Korolev

Corresponding author

e-mail: tony.korolev@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-1952-2238>

SPIN code: 8701-6779

Junior researcher at the laboratory of Psychopharmacology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Волкова Анна Валерьевна

e-mail: volk16@inbox.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0914-2825>

SPIN-код: 9587-6581

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

Anna V. Volkova

e-mail: volk16@inbox.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0914-2825>

SPIN code: 9587-6581

Researcher at the laboratory of psychopharmacology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Козин Ярослав Сергеевич

e-mail: Kozin_yaroslav@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-8226-6549>

Лаборант-исследователь лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Yaroslav S. Kozin

e-mail: Kozin_yaroslav@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-8226-6549>

Laboratory assistant at the laboratory of psychopharmacology FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Мокров Григорий Владимирович

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

Grigory V. Mokrov

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

Воронина Татьяна Александровна

e-mail: voroninata38@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3566-6203>

SPIN-код: 5766-3452

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

Tatiana A. Voronina

e-mail: voroninata38@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3566-6203>

SPIN code: 5766-3452

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

Калинина Татьяна Сергеевна

e-mail: tat.calinina2009@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/000-0002-0178-3567>

д. м. н., в. н. с лаборатории

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

Tatiana S. Kalinina

e-mail: tat.calinina2009@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/000-0002-0178-3567>

Dr. Sci. (Med.), Leading researcher at the Laboratory of psychopharmacology, FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Psychiatry*. 2022 Feb;9(2):137–150. DOI: 10.1016/S2215-0366(21)00395-3.

2. Wainberg ML, Scorza P, Shultz JM, et al. Challenges and Opportunities in Global Mental Health: a Research-to-Practice Perspective. *Curr Psychiatry Rep*. 2017 May;19(5):28. DOI: 10.1007/s11920-017-0780-z.

3. Мокров Г.В., Молодавкин Г.М., Лихошерстов А.М. и др. Синтез и нейротропная активность производных пирроло[1,2-а]-пиразинов. *Психофармакология и биологическая наркологи́я*. 2007;7(2):1856. [Mokrov GV, Molodavkin GM, Likhosherstov AM, et al. Sintez i neiropro-tekktivnaya aktivnost proizvodnykh pirrolo[1,2a] pirazinov. *Psikhofarmakologia i biologicheskaya narkologiya*. 2007;7(2):1856. (In Russ.)].

4. Rashid MA, Ashraf A, Rehman SS, et al. 1,4-Diazepines: A Review on Synthesis, Reactions and Biological Significance. *Curr Org Synth*. 2019;16(5):709–729. DOI: 10.2174/1570179416666190703113807.

5. Мокров Г.В., Лихошерстов А.М., Посева В.И. и др. Синтез, антидепрессивная и анксиолитическая активность 1,2,3,4-тетрагидро-3Н-пирроло[1,2а][1,4]дiazепин-3-онов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2013;47(9):12–17. [Mokrov GV, Likhosherstov AM, Poseva VI, et

al. Synthesis and antidepressant and anxiolytic activity of 1,2,4,5-tetrahydro-3H-pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-3-ones. *Khimiko-farmaceuticheskiy zhurnal*. 2013;47(9):12–17. (In Russ.)].

6. Pollak DD, Rey CE, Monje FJ. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. *Ann Med*. 2010 May 6;42(4):252–64. DOI: 10.3109/07853891003769957.

7. Castagné V, Moser P, Porsolt RD. Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition, Chapter 6. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009.

8. Kudryashov NV, Kalinina TS, Shimshirt AA, et al. Antidepressant-like effect of fluoxetine may depend on translocator protein activity and pretest session duration in forced swimming test in mice. *Behav Pharmacol*. 2018 Jun;29(4):375–378. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000359.

9. Кудряшов Н.В. Экспериментальное изучение психотропной активности производных пиразоло[с]пиримидина ГИЖ-72 и пирролодiazепина ГМАЛ-24 в условиях непредсказуемого хронического умеренного стресса: Дисс. ... канд. биол. наук. — Москва; 2015. [Kudryashov NV. Eksperimentalnoe izuchenie psikhotropnoi aktivnosti proizvodnykh pirazolo[c]pirimidina GIZH-72 i pirrolo-diazepina GMAL-24 v usloviakh nepredskazuemogo hronicheskogo umerennogo stressa: [dissertation] Moscow; 2015. (In Russ.)]. URL: <https://elck.ru/35tYzY>. Ссылка активна на 03.08.2023.

Изучение взаимосвязи между тяжестью течения алкогольной кардиомиопатии и уровнем потребления алкоголя у самцов и самок крыс на модели «бытового пьянства»

© Крыжановский С. А., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Барчуков В. В., Столярук В. Н., Вититнова М. Б., Колик Л. Г., Дурнев А. Д.

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

Аннотация. Введение. Ранее на разработанной нами трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии (АКМП) у беспородных белых крыс, воспроизводящей основные клинико-диагностические признаки этого заболевания, показано, что у крыс обоего пола в условиях постоянной 24/7 алкоголизации в течение 24 недель формируется АКМП. **Цель настоящего исследования** — сравнительная оценка особенностей формирования АКМП у самцов и самок крыс в зависимости от уровня потребления этанола в модельных экспериментах, имитирующих «бытовое пьянство», при периодической алкоголизации 24/2 в течение 24 недель. **Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах, рандомизированных на 4 группы: 1-я группа — контрольные крысы-самцы ($n = 18$), 2-я группа — контрольные крысы-самки ($n = 18$), 3-я группа — алкоголизованные крысы-самцы ($n = 39$) и 4-я группа — алкоголизованные крысы-самки ($n = 19$). Контрольные животные получали обычный рацион питания и свободный доступ к воде. Животные 3-й и 4-й групп еженедельно, в течение 24 недель, с 22:00 пятницы по 8:00 понедельника в качестве единственного источника жидкости получали 10 % раствор этанола при неограниченном доступе к стандартному корму, а в остальные дни обычный рацион. **Результаты.** У животных обоего пола через 24 недели от начала потребления раствора этанола формируется АКМП, о чем свидетельствует увеличение конечно-систолического и конечно-диастолического размеров левого желудочка сердца ($p = 0,0001$) и снижение его фракции выброса ($p = 0,0001$), при этом степень патологического ремоделирования миокарда более выражена у самок. Согласно кластерному анализу, по потреблению этанола (ПЭ) животные обоего пола подразделяются на 3 подгруппы: низкое, среднее и высокое ПЭ, однако у самцов превалирует подгруппа со средним ПЭ — 56 %, а у самок с высоким ПЭ — 47 % ($p = 0,0286$), подгруппа с низким ПЭ минимальна (16 %). При этом, если у самцов во всех подгруппах, начиная с 8-й недели алкоголизации, ПЭ динамически снижается, то у самок в подгруппах со средним и высоким ПЭ оно, начиная с 16-й недели, возрастает. Установлено, что степень ремоделирования левого желудочка сердца у самок с высоким и средним ПЭ почти в 2 раза выше, чем у самцов ($p < 0,05$). **Заключение.** В модельных экспериментах, имитирующих «бытовое пьянство», показано, что у самок интенсивность ремоделирования левого желудочка сердца значимо больше, чем у самцов, что, по-видимому, определяется выявленными зависимыми от пола разнонаправленными тенденциями в формировании алкогольного поведения, характеризующегося динамическим ростом потребления этанола у самок крыс по мере нарастания сроков алкоголизации.

Ключевые слова: крысы самцы и самки; алкогольная кардиомиопатия; эхокардиография; ремоделирование; потребление этанола; половые различия

Для цитирования:

Крыжановский С. А., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Барчуков В. В., Столярук В. Н., Вититнова М. Б., Колик Л. Г., Дурнев А. Д. Изучение взаимосвязи между тяжестью течения алкогольной кардиомиопатии и уровнем потребления алкоголя у самцов и самок крыс на модели «бытового пьянства». *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):82–93. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-82-93>

Поступила: 19.07.2023. В доработанном виде: 25.07.2023. Принята к печати: 15.08.2023. Опубликовано: 30.09.2023.

Study of the relationship between the severity of alcoholic cardiomyopathy and the level of alcohol consumption in male and female rats in the model of “home drinking”

© Sergey A. Kryzhanovskii, Iosif B. Tsorin, Ekaterina O. Ionova, Vladimir V. Barchukov, Valeriy N. Stolyaruk, Marina B. Vititnova, Larisa G. Kolik, Andrey D. Durnev

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

Abstract. Background. Earlier, on the translational model of alcoholic cardiomyopathy (ACMP) developed by us in outbred white rats, which reproduces the main clinical diagnostic signs of this disease, it was shown that in rats of both sexes under conditions of constant 24/7 alcoholization for 24 weeks, ACMP is formed. **This study purpose** is a comparative assessment of the features of the ACM formation in male and female rats depending on the level of ethanol consumption in model experiments simulating “domestic drunkenness” with periodic alcoholization 24/2 for 24 weeks. **Materials and methods.** Experiments were performed on outbred white rats randomized into 4 groups: group 1 — control male rats ($n=18$), group 2 — control female rats ($n = 18$), group 3 — alcoholized male rats ($n = 39$) and group 4 — alcoholized female rats ($n = 19$). Control animals received a normal diet and free access to water. Animals of the 3rd and 4th groups weekly, for 24 weeks, from Friday 22.00 to Monday 8.00, received a 10 % ethanol solution as the only source of liquid with unlimited access to standard food, and the usual diet on the remaining days. **Results.** In animals of both sexes, after 24 weeks from the consumption start of the ethanol solution, ACM is formed, as evidenced by an increase in the end-systolic and end-diastolic sizes of the left ventricle of the heart ($p = 0.0001$) and a decrease in its ejection fraction ($p = 0.0001$), while the degree of pathological myocardial remodeling is more pronounced in females. According to cluster analysis, by the consumption of ethanol (CET), animals of both sexes are divided into 3 subgroups: low, medium and high CET, however, in males, the subgroup with an average CET prevails — 56 %, and in females with a high CET — 47 % ($p = 0.0286$), the low CET subgroup is minimal (16 %). At the same time, if in males in all subgroups, starting from the 8th week of alcoholization, CET dynamically decreases, then how in females in subgroups with medium and high CET, starting from the 16th week, it increases. It was found that the degree of left ventricular remodeling in females with high and moderate CET was almost 2 times higher than in males ($p < 0.05$). **Conclusion.** In model experiments imitating “domestic drunkenness”, it was shown that in females the intensity of the left ventricle heart remodeling is significantly higher than in males, which, apparently, is determined by the identified gender-dependent multidirectional trends in the formation of alcoholic behavior characterized by dynamic growth. consumption of ethanol in female rats as the duration of alcoholization increases.

Keywords: male and female rats; alcoholic cardiomyopathy; echocardiography; remodeling; ethanol consumption; sex differences

For citations:

Kryzhanovskii SA, Tsoirin IB, Ionova EO, Barchukov VV, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kolik LG, Durnev AD. Study of the relationship between the severity of alcoholic cardiomyopathy and the level of alcohol consumption in male and female rats in the model of "home drinking". *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):82–93. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-82-93>

Received: 17.07.2023. **Revision received:** 25.07.2023. **Accepted:** 15.08.2023. **Published:** 30.09.2023.

Введение / Introduction

По данным ВОЗ, в настоящее время в мире насчитывается не менее 140 млн лиц, страдающих хроническим алкоголизмом, и более 400 млн индивидуумов, злоупотребляющих алкоголем. Согласно отчёту ВОЗ за 2018 год, Российская Федерация в рейтинге злоупотребления алкогольными напитками занимает 16-е место с уровнем потребления алкоголя на душу населения в среднем 11,7 л в год [1], однако распространённость алкоголизма в нашей стране продолжает оставаться стабильно высокой [2]. Особую остроту этой проблеме придаёт тот факт, что в последнее десятилетие отмечается рост числа женщин, страдающих алкоголизмом, преимущественно молодого и среднего возраста, при этом часто алкоголизм приобретает характер «семейной болезни» [3].

Основной причиной соматической летальности при продолжительном чрезмерном потреблении алкоголя является алкогольная кардиомиопатия (АКМП). По данным Росстата, смертность от АКМП составляет 51–64 % у мужчин, а у женщин — 46–59 % от всех аутопсий больных алкоголизмом [4], при этом 35–40 % пациентов, страдающих АКМП, погибают от внезапной сердечной смерти [5]. Относительная частота возникновения АКМП у обоих полов одинакова, однако у женщин эта патология формируется в более короткие сроки после начала злоупотребления алкоголем и при его приёме в меньших количествах [6, 7]. Кроме того, злокачественные нарушения ритма сердца у женщин возникают при употреблении меньших доз алкоголя [8, 9].

Если особенности течения и соматические осложнения хронического алкоголизма у мужчин и женщин достаточно хорошо изучены, то особенности половых различий соматического статуса индивидуумов при систематическом бытовом пьянстве во многом остаются *terra incognita*. В частности, практически отсутствуют клинические исследования особенностей формирования и течения сердечно-сосудистой патологии при бытовом пьянстве у мужчин и женщин. Экспериментальные работы, посвящённые этой проблеме, в литературе не представлены.

Ранее на разработанной нами трансляционной модели АКМП у крыс, воспроизводящей основные клинико-диагностические признаки этого заболевания, было показано, что у крыс обоего пола в условиях постоянной принудительной алкоголизации 24/7 в течение 24 недель формируется АКМП [10, 11]. Результаты эхокардиографических исследований свидетельствуют о наличии у алкоголизированных животных

патогномоничной для этой патологии выраженной, статистически значимой дилатации левого желудочка сердца и снижении его инотропной функции. Данные эхокардиографии напрямую коррелировали с результатами морфометрических (дилатация полостей сердца), гистологических (жировая инфильтрация миокарда, полиморфизм кардиомиоцитов и др.) и электрофизиологических (снижение электрической стабильности кардиомиоцитов) исследований, что позволяет рассматривать эхокардиографию как валидный метод диагностики АКМП у крыс [10, 12].

Цель настоящего исследования — сравнительная оценка особенностей формирования АКМП у самцов и самок крыс в зависимости от уровня потребления этанола в модельных экспериментах, имитирующих «бытовое пьянство», при периодической алкоголизации в режиме 24/2.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Опыты проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой в начале эксперимента 180–200 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали с предоставлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме в соответствии с приказом Минздрава России № 199н от 01 апреля 2016 г. «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. Животные опытных и контрольных групп содержались в индивидуальных клетках стандарта Т/3. Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/ЕЕС)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией. На проведение экспериментов с животными получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (протокол № 1 от 29 января 2021 г.).

Препараты. Спирт этиловый 96 %, разбавленный дистиллированной водой до 10 % (ООО «Главспирт»), кетамин (субстанция, ФГУП «Московский эндокринный завод» Россия)

Модель «бытового пьянства». Животных рандомизировали на 4 группы: 1-я группа — контрольные крысы-самцы ($n = 18$), 2-я группа — контрольные крысы-самки ($n = 18$), 3-я группа — алкоголизованные крысы-самцы ($n = 39$) и 4-я группа — алкоголизованные крысы-самки ($n = 19$). Животные 1-й и 2-й групп в течение всего эксперимента получали обычный рацион питания и свободный доступ к воде. Животные 3-й и 4-й групп в период с понедельника по пятницу, еженедельно, в течение 24 недель получали обычный рацион питания и свободный доступ к воде. С 22:00 пятницы по 8:00 понедельника в качестве единственного источника жидкости животные получали 10 % раствор этанола. На протяжении всего исследования еженедельно регистрировали количество потребляемого этанола (г/кг). Все животные этой группы активно потребляли физиологически значимое количество 10 % раствора этанола. В пересчёте на чистый этанол среднее потребление алкоголя вне зависимости от пола варьировало в пределах 3,5–6,8 г/кг в сутки.

Эхокардиографические исследования. Наркотизированных животных (кетамин 100 мг/кг, в/б) фиксировали в положении на спине. Измерения производили в условиях закрытой грудной клетки и спонтанного дыхания в одномерном М- и двухмерном В-модальных режимах при положении датчика эхокардиографа в парастернальной позиции по длинной оси сердца. В М-модальном режиме оценивали конечно-систолический и конечно-диастолический размеры (КСР и КДР), затем по методу Teichholz рассчитывали показатели сократительной функции сердца — фракцию выброса (ФВ) и фракцию укорочения (ФУ) левого желудочка. Оценку эхокардиографических показателей проводили как минимум по 5 последовательным сердечным циклам. Все измерения выполняли в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии [13]. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф DP-6600 с электронным микроконвексным датчиком 65C15EA (6,5/8,0 МГц). Оценку показателей внутрисердечной гемодинамики проводили до включения животных в эксперимент и через 24 недели алкоголизации.

Статистический анализ. Данные о среднесуточном потреблении этанола (г/кг) через 8, 16 и 24 недель алкоголизации обрабатывали с помощью кластерного анализа к-средних. Выборки разбивали на три кластера. Нормальность распределения внутри кластеров проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, равенство дисперсий — по Левену. Так как распределение данных не отличалось от нормального, а дисперсии выборок были гомогенны, то значимость различий между и внутри кластеров определяли с помощью двух-

факторного дисперсионного анализа (факторы: пол и потребление этанола) и дисперсионного анализа повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену–Кейлсу. При обработке эхокардиографических данных нормальность распределения и гомогенность дисперсий проверяли, как описано выше, дальнейшую обработку проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (факторы: пол, алкоголизация или пол, уровень потребления этанола) и метода множественных сравнений по Дункану. Также обрабатывали данные измерений массы животных разного пола после 24-недельной алкоголизации. Результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Данные, регистрируемые в качественной шкале, обрабатывали с помощью метода точной вероятности Фишера. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Эхокардиографические исследования

Основываясь на ранее полученных экспериментальных данных по формированию АКМП при хронической принудительной алкоголизации, мы при помощи эхокардиографии оценили влияние систематического периодического приёма алкоголя (2 дня в неделю в течение 24 недель) на геометрию левого желудочка сердца и его инотропную функцию.

У всех включённых в исследование животных перед рандомизацией эхокардиографические показатели колебались в пределах физиологической нормы. Через 4 нед. наблюдений у контрольных крыс обоего пола регистрируемые показатели практически не изменились, отмечалось лишь связанное с увеличением массы и возраста животных некоторое увеличение КСР и КДР.

Согласно данным эхокардиографии, через 24 недели периодического потребления алкоголя у животных обоего пола формируется АКМП, однако выявленные изменения у самок существенно больше, чем у самцов (табл. 1, рис. 1).

На следующем этапе анализа данных мы попытались ответить на вопрос, как связаны выявленные различия в формировании АКМП у самцов и самок с особенностями зависимого от пола алкогольного поведения.

Исследования алкогольного поведения

Кластерный анализ потребления этанола (ПЭ) самцами и самками, периодически потреблявшими алкоголь в течение 24 недель, позволил разделить их на три подгруппы: животные с низким, средним и высоким ПЭ. Среди самцов наибольшее количество животных (56 %) оказалось в подгруппе со средним ПЭ, в подгруппах с низким и высоким ПЭ этот показатель составил 26 % и 18 %, соответственно (рис. 2). Аналогичное распределение животных по подгруппам было отмечено нами ранее при анализе потребления

Таблица 1

Сравнение геометрии и инотропной функции сердца самцов и самок крыс после периодической (2 дня в неделю) принудительной алкоголизации в течение 24 недель

Table 1

Comparison of the heart geometry and inotropic function of male and female rats after periodic (2 days per week) forced alcoholization for 24 weeks

	Пол	n	КСР, мм	КДР, мм	ФУ, %	ФВ, %
Интактные крысы	Самцы	18	2,11±0,07	4,12±0,10	48,9±0,8	85,6±0,9
	Самки	18	1,31±0,07 <i>p</i> = 0,0001	3,01±0,10 <i>p</i> = 0,0001	56,6±0,8 <i>p</i> = 0,0001	91,2±0,9 <i>p</i> = 0,0001
Алкоголизованные крысы	Самцы	35	3,04±0,05 <i>p</i> ₁ = 0,0001	4,73±0,07 <i>p</i> ₁ = 0,0001	35,8±0,5 <i>p</i> ₁ = 0,0001	71,7±0,6 <i>p</i> ₁ = 0,0001
	Самки	17	2,67±0,07 <i>p</i> = 0,0004 <i>p</i> ₁ = 0,0001	4,23±0,10 <i>p</i> = 0,0005 <i>p</i> ₁ = 0,0001	36,9±0,8 <i>p</i> = 0,25 <i>p</i> ₁ = 0,0001	73,1±0,9 <i>p</i> = 0,23 <i>p</i> ₁ = 0,0001
Фактор пол <i>df</i> = 1			F = 72,92 <i>p</i> _F < 0,0001	F = 71,68 <i>p</i> _F < 0,0001	F = 39,18 <i>p</i> _F < 0,0001	F = 18,28 <i>p</i> _F < 0,0001
Фактор алкоголизация <i>df</i> = 1			F = 282,96 <i>p</i> _F < 0,0001	F = 93,94 <i>p</i> _F < 0,0001	F = 533,58 <i>p</i> _F < 0,0001	F = 377,98 <i>p</i> _F < 0,0001
Взаимодействие факторов <i>df</i> = 1			F = 10,25 <i>p</i> _F = 0,0019	F = 10,5 5 <i>p</i> _F = 0,0017	F = 21,43 <i>p</i> _F < 0,0001	F = 6,52 <i>p</i> _F = 0,0125

Примечания: Представлены средние арифметические и их стандартные ошибки; F — квантиль распределения Фишера-Снедекора; *df* — число степеней свободы; *n* — число животных в группе; *p* — указано по отношению к самцам; *p*₁ — по отношению к интактным крысам того же пола; *p*_F — значимость эффективности действия фактора.

Notes: Arithmetic means and their standard errors are presented; F— is the Fisher's-Snedekor's distribution quantile; *df* — is the number of freedom degrees; *n* — number of animals in the group; *p* — indicated in relation to males; *p*₁ — in relation to intact rats of the same sex; *p*_F — is the significance of the effectiveness of the factor.

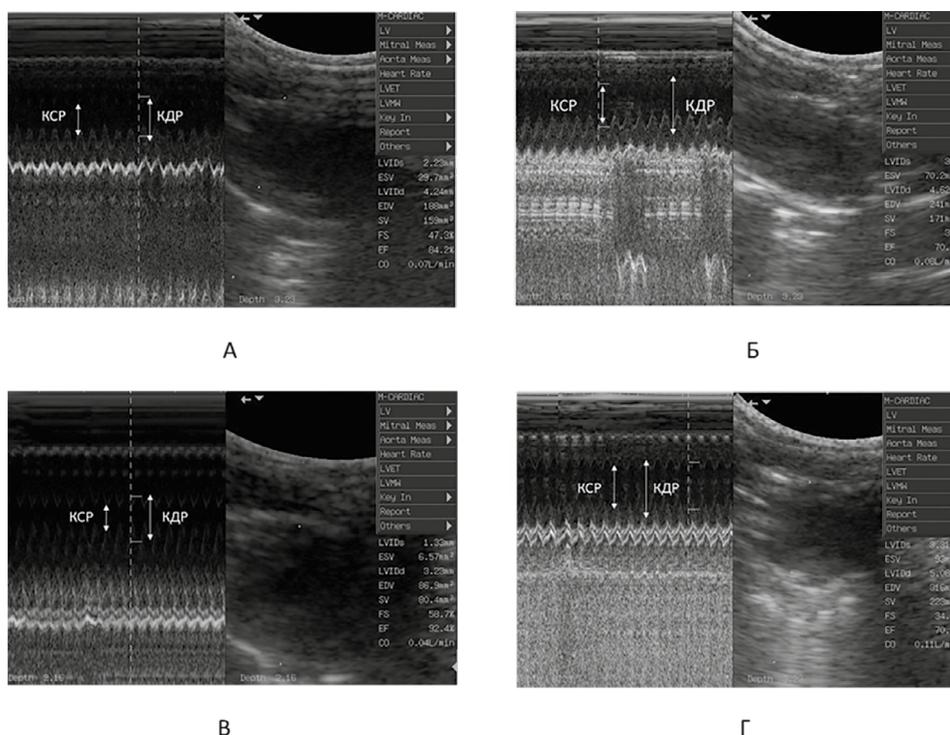


Рис. 1. Эхокардиограммы интактных и алкоголизованных (принудительное потребление 10 % этанола в течение 24 недель по 2 сут/нед.) самцов и самок крыс. А — интактный самец; Б — алкоголизованный самец; В — интактная самка; Г — алкоголизованная самка

Fig. 1. Echocardiograms of intact and alcoholized (forced consumption of 10 % ethanol for 24 weeks, 2 days/week) male and female rats. A — intact male; B — alcoholized male; C — intact female; G — alcoholized female

Примечания: КСР — конечно-систолический размер левого желудочка сердца; КДР — конечно-диастолический размер левого желудочка сердца

Notes: КСР — end-systolic size of the left ventricle of the heart; КДР — end-diastolic size of the left ventricle of the heart.

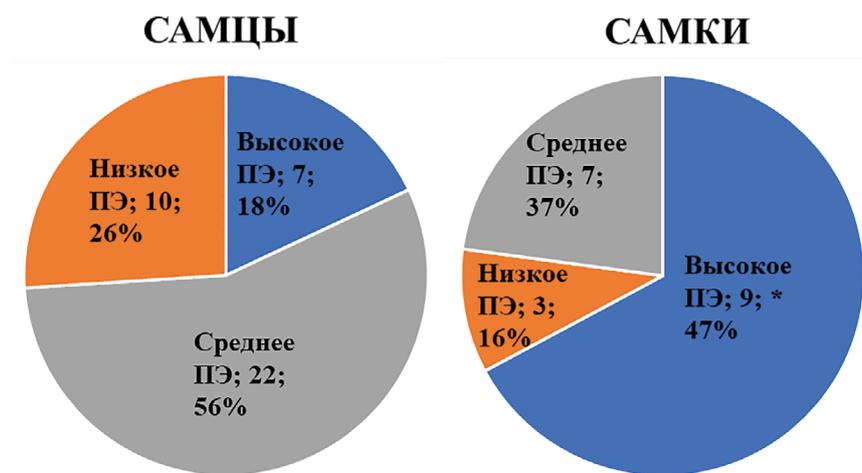


Рис. 2. Распределение с помощью кластерного анализа самцов и самок крыс, подвергнутых принудительной периодической алкоголизации, по подгруппам с низким, средним и высоким ПЭ

Fig. 2. Cluster analysis distribution of male and female rats subjected to forced periodic alcoholization into subgroups with low, medium and high CET.

Примечание: * — $p < 0,05$ по отношению к числу самцов в подгруппе с высокой ПЭ.

Note: * — $p < 0.05$ in relation to the number of males in the subgroup with high CET.

алкоголя у крыс самцов, подвергнутых постоянной принудительной алкоголизации [14].

Двухфакторный дисперсионный анализ позволил установить, что действие факторов — пол, ПЭ и их взаимодействие — были статистически значимы ($p = 0,049$, $p < 0,0001$, $p = 0,032$, соответственно). Дальнейшая обработка с помощью критерия множественных сравнений по Ньюмену–Кейлсу показала, что различия между подгруппами по потреблению этанола статистически значимы (табл. 2, рис. 3). Если у самцов в

подгруппе с низким ПЭ на 24-й неделе среднесуточное потребление составляло $3,6 \pm 0,1$ г/кг, то в подгруппах со средним и высоким ПЭ эта величина была значимо выше — $4,6 \pm 0,1$ ($p = 0,021$) и $5,4 \pm 0,2$ ($p = 0,0002$) г/кг, соответственно. Аналогичная картина была отмечена у самок крыс.

Однако характер потребления этанола у самок существенно отличался от такового у самцов: наибольшее число животных выявлено в подгруппе с высоким ПЭ (47%), несколько меньше животных —

Таблица 2

Динамика среднесуточного потребления этанола (г/кг/сут) у самцов и самок крыс в условиях периодической (2 дня в неделю) принудительной алкоголизации в течение 24 недель

Table 2

Dynamics of the average daily consumption of ethanol (g/kg/day) in male and female rats under conditions of periodic (2 days per week) forced alcoholization for 24 weeks

Пол	Уровень ПЭ	Число животных в группе	Потребление этанола, недели		
			8	16	24
Самцы	Низкий	10	$4,1 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,1$
	Средний	22	$5,3 \pm 0,1^{**}$	$5,0 \pm 0,1^{**}$	$4,6 \pm 0,1^{* \wedge \wedge}$
	Высокий	7	$6,8 \pm 0,3^{***\#\#}$	$5,9 \pm 0,2^{**}$	$5,4 \pm 0,2^{** \wedge}$
Самки	Низкий	3	$4,7 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,2^{\wedge}$	$3,8 \pm 0,3^{\wedge}$
	Средний	7	$4,8 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,2^{*}$
	Высокий	9	$5,7 \pm 0,1^{**\#\&\&}$	$5,4 \pm 0,2^{**\#\}$	$5,9 \pm 0,3^{**\#\#\}$

Примечания: данные представлены в виде средних арифметических и их стандартных ошибок; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ — статистически значимые отличия по отношению к животным того же пола с низким ПЭ; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ — по отношению к животным того же пола со средним ПЭ; && $p \leq 0,01$ — по отношению к самцам с высоким ПЭ; ^ $p \leq 0,05$, ^^ $p \leq 0,01$ — по отношению к уровню на 8-й неделе.

Notes: data are presented as arithmetic means and their standard errors; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ — statistically significant differences in relation to animals of the same sex with low CET; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$ — in relation to animals of the same sex with average CET; && $p \leq 0.01$ — in relation to males with high CET; ^ $p \leq 0.05$, ^^ $p \leq 0.01$ — in relation to the level at the 8th week.

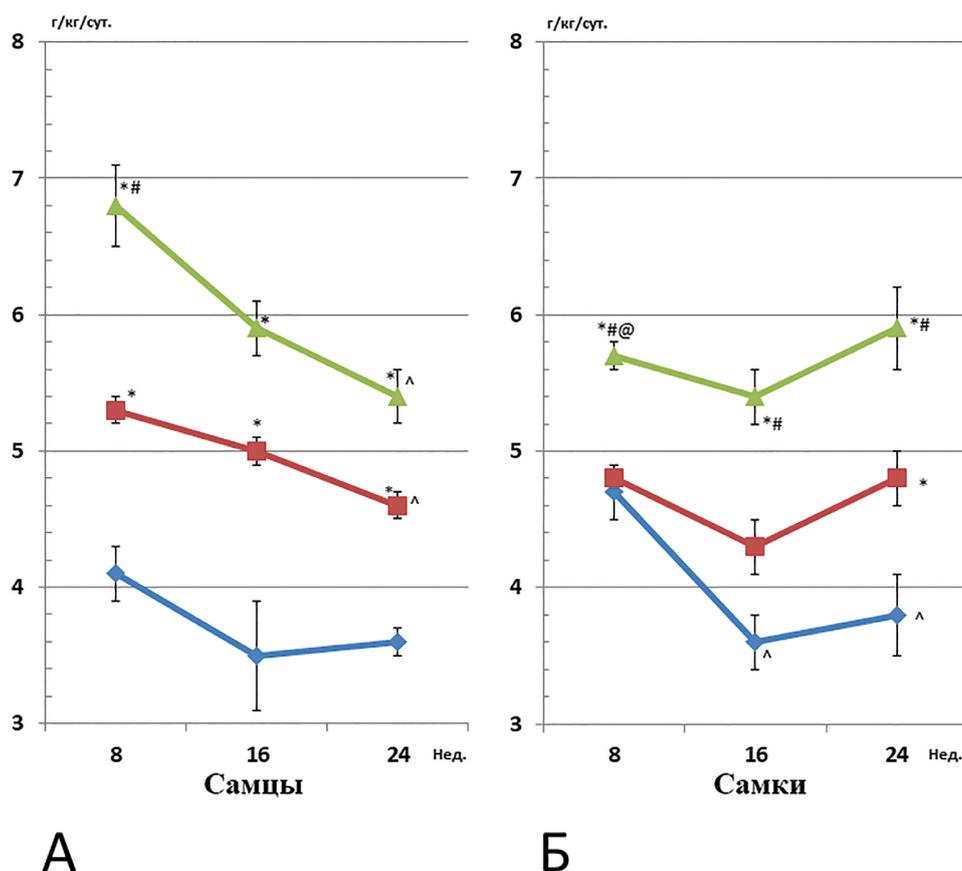


Рис. 3. Динамика изменений среднесуточного потребления этанола у самцов и самок крыс, подвергнутых принудительной периодической алкоголизации в течение 24 недель

Fig. 3. Dynamics of changes in the average daily consumption of ethanol in male and female rats subjected to forced periodic alcoholization for 24 weeks

Примечания: По оси ординат среднесуточное потребление этанола (г/кг); по оси абсцисс период алкоголизации (недели). Сверху вниз динамика в подгруппах с высоким, средним и низким ПЭ. * — $p < 0,05$ по отношению к крысам того же пола с низким ПЭ; # — $p < 0,05$ по отношению к крысам того же пола со средним ПЭ; @ — $p < 0,05$ по отношению к самцам с тем же уровнем ПЭ; ^ — $p < 0,05$ по отношению к уровню ПЭ на 8-й неделе.

Notes: Y-axis average daily consumption of ethanol (g/kg); on the abscissa, the period of alcoholization (weeks). From top to bottom dynamics in subgroups with high, medium and low CET. * — $p < 0.05$ in relation to rats of the same sex with low CET; # — $p < 0.05$ in relation to rats of the same sex with an average CET; @ — $p < 0.05$ in relation to males with the same level of CET; ^ — $p < 0.05$ in relation to the level of CET at the 8th week.

в подгруппе со средним ПЭ (37 %), тогда как в подгруппе с низким ПЭ — только 16 % крыс (см. рис. 2). При этом у самок, так же как и у самцов, различия в потреблении раствора этанола между подгруппами с низким ПЭ и подгруппами со средним и высоким ПЭ статистически значимы — $p = 0,014$ и $p = 0,0001$, соответственно (см. табл. 2, рис. 3).

Животные с высоким уровнем ПЭ среди самок встречались чаще, чем среди самцов ($p = 0,0286$), однако наиболее выраженные половые различия наблюдались при анализе динамики среднесуточного потребления. У самцов с низким ПЭ изменения потребления раствора этанола с 8-й по 24-ю неделю алкоголизации были

статистически незначимы. В то же время в подгруппах со средним и высоким ПЭ этот показатель динамически снижался (табл. 2, рис. 3А). У самок наблюдалась принципиально другая картина. В подгруппе с низким ПЭ потребление с 8-й по 16-ю неделю алкоголизации уменьшалось с $4,7 \pm 0,2$ до $3,6 \pm 0,2$ ($p = 0,047$) и оставалось к 24-й неделе на этом же уровне (табл. 2, рис. 3Б). Напротив, у самок со средним и высоким ПЭ в период с 8-й по 16-ю недели, как и у самцов, снижалось количество выпитого алкоголя. Однако, начиная с 16-й недели периодической алкоголизации, в этих подгруппах ПЭ динамически возрастает, достигая максимума к концу 24-й недели (рис. 3Б). Эти данные свидетельствуют

о том, что у самок, в отличие от самцов, в условиях данной модели «бытового пьянства» при увеличении сроков алкоголизации происходит рост количества потребляемого алкоголя.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы, согласно которым самки крыс линии NAD-1 добровольно потребляли этанол в больших количествах, чем самцы [15]. В недавно опубликованном исследовании *Amodeo LR с соавт.* (2018 г.) показано, что самки крыс, получавшие в подростковом возрасте 20 % раствор этанола *per os* и одновременно вдыхавшие пары этанола во взрослом возрасте добровольно три дня в неделю (в понедельник, среду и пятницу), потребляли алкоголь в больших количествах, чем самцы, алкоголизованные в подростковом возрасте так же как и самки [16]. Близкие результаты были получены и в других исследованиях при добровольном постоянном и прерывистом потреблении этанола (по понедельникам средам и пятницам) [17, 18]. Важно отметить, что это соотношение в потреблении этанола между полами сохранялось на любой стадии эстрального цикла у самок [18, 19].

Повышенное предпочтение алкоголя самками, возможно, связано с влиянием эстрогенов. В опытах на крысах-самках показано, что увеличение содержания в крови эндогенного эстрогена увеличивает потребление этанола [20], а согласно клиническим наблюдениям, уровень потребления этанола положительно коррелирует с концентрацией эндогенного эстрогена [21].

В соответствии с данными клинических исследований, женщины, особенно в отрицательных эмоциональных состояниях, имеют повышенную склонность к употреблению алкоголя по сравнению с мужчинами [22, 23]. В контексте настоящего исследования следует отметить, что все животные в течение 24 недель находились в индивидуальных клетках, т. е. в условиях, имитирующих хронический изоляционный стресс, к которому большую чувствительность, как правило, проявляют самки крыс [24].

В 2019 г. в журнале *Drug Alcohol Depend* были опубликованы результаты крупного клинического аналитического исследования, включившего в себя 443 испытуемых (287 мужчин и 156 женщин) с диагнозом алкогольной зависимости, согласно которому пожизненный анамнез мужчин был связан с меньшим количеством «запойных» дней ($p = 0,0084$) и дней интенсивного злоупотребления алкоголем ($p = 0,021$) [25].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что у самцов наибольшее количество животных (56 %) приходится на группу со средним ПЭ, тогда как у самок наибольшее число животных (47 %) находится в группе с высоким ПЭ. Не менее важно и то, что если в подгруппах самцов с высоким и средним ПЭ количество потребляемого алкоголя снижается, то у самок в аналогичных группах в период с 16-й по 24-ю недели отмечается динамический рост потребления этанола.

Анализ взаимосвязи между полом животного, степенью формирования АКМП и количеством потребляемого алкоголя

Согласно результатам двухфакторного дисперсионного анализа, оба изучаемых фактора (пол и ПЭ) и их взаимодействие обладали статистически значимым влиянием на геометрию и инотропную функцию левого желудочка сердца (табл. 3). Дальнейший статистический анализ с помощью критерия множественных сравнений по Дункану свидетельствует о том, что у животных обоих полов, потреблявших алкоголь, КСР и КДР значительно больше, а ФУ и ФВ значительно меньше, чем у интактных крыс (табл. 3, рис. 4). Так, например, если у интактных крыс-самцов КСР и ФВ в среднем были равны $2,11 \pm 0,07$ мм и $85,6 \pm 0,9$ %, соответственно, то у животных того же пола со средним ПЭ эти показатели составляли $3,09 \pm 0,07$ мм ($p < 0,0001$) и $71,8 \pm 0,8$ % ($p < 0,0001$), соответственно. Сходная картина наблюдалась и у самок. Если у интактных самок КСР и ФВ в среднем равны $1,31 \pm 0,07$ мм и $91,2 \pm 0,9$ %, соответственно, то у животных со средним ПЭ — $2,76 \pm 0,12$ мм ($p < 0,0001$) и $71,8 \pm 1,4$ % ($p < 0,0001$), соответственно. Качественно такие же изменения геометрии и инотропной функции ЛЖ наблюдались у крыс обоего пола при низком и высоком ПЭ (табл. 3, рис. 4).

Таким образом, анализ данных эхокардиографических исследований, проведённых на крысах, периодически потреблявших раствор этанола в течение 24 недель, показал, что у животных вне зависимости от пола происходят характерные для АКМП изменения геометрии и инотропной функции левого желудочка, а именно, статистически значимо увеличиваются КСР и КДР левого желудочка сердца, а его ФУ и ФВ снижаются ($p < 0,0001$).

Распределение с помощью кластерного анализа животных на подгруппы с разным уровнем ПЭ дало возможность выявить различия в интенсивности ремоделирования левого желудочка сердца, наблюдаемые у самок и самцов через 24 недели периодической алкоголизации, в зависимости от уровня ПЭ. Так, у алкоголизованных самцов в подгруппах с низким, средним и высоким ПЭ наблюдались практически одинаковые значения КСР, ФУ и ФВ (см. табл. 3, рис. 4), которые статистически значимо отличались от таковых показателей у интактных животных. Например, у самцов с низким, средним и высоким ПЭ ФВ была равна $71,8 \pm 1,2$ %, $71,8 \pm 0,8$ % и $71,1 \pm 1,4$ %, соответственно, в то время как у интактных животных этот показатель был равен $85,6 \pm 0,9$ % ($p < 0,0001$). Другая картина наблюдалась у самок. Если у крыс-самок со средним и высоким ПЭ КСР, ФУ и ФУ статистически значимо не различались, то у животных в подгруппе с низким ПЭ КСР был статически значимо меньше, а ФУ и ФВ выше по сравнению с крысами-самками со средним и высоким ПЭ (см. табл. 3, рис. 4). При этом во всех подгруппах самок, периодически потреблявших алкоголь, эхокардиографические показатели статистически

Таблица 3

Сравнение геометрии и инотропной функции сердца самцов и самок крыс с различным уровнем потребления этанола после периодической (2 дня в неделю) принудительной алкоголизации в течение 24 недель

Table 3

Comparison of the heart geometry and inotropic function of male and female rats with different levels of ethanol consumption after periodic (2 days per week) forced alcoholization for 24 weeks

Уровень потребления этанола	Пол	n	Конечно-систолический размер ЛЖ, мм	Конечно-диастолический размер ЛЖ, мм	Фракция укорочения ЛЖ, %	Фракция выброса ЛЖ, %
Интактные крысы	Самцы	18	2,11±0,07 <i>p</i> = 0,0001	4,12±0,10 <i>p</i> < 0,0001	48,9 ± 0,8 <i>p</i> = 0,0001	85,6±0,9 <i>p</i> = 0,0037
	Самки	18	1,31±0,07	3,01±0,10	56,6 ± 0,8	91,2±0,9
Низкое	Самцы	9	3,00±0,10 <i>p</i> = 0,0008 <i>p</i> ₁ < 0,0001	4,67±0,14 <i>p</i> = 0,0094 <i>p</i> ₁ = 0,0247	35,8±1,1 <i>p</i> = 0,0175 <i>p</i> ₁ < 0,0001	71,8±1,2 <i>p</i> = 0,0072 <i>p</i> ₁ < 0,0001
	Самки	3	2,41±0,18 <i>p</i> ₁ < 0,0001	4,03±0,25 <i>p</i> ₁ = 0,0001	40,2±1,8 <i>p</i> ₁ < 0,0001	77,2±2,2 <i>p</i> ₁ < 0,0001
Среднее	Самцы	19	3,09±0,07 <i>p</i> = 0,0574 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,553	4,82±0,10 <i>p</i> = 0,0312 <i>p</i> ₁ = 0,0046 <i>p</i> ₂ = 0,498	35,9±0,7 <i>p</i> = 0,975 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,968	71,8±0,8 <i>p</i> = 0,974 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,990
	Самки	7	2,76±0,12 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,0348	4,30±0,16 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,259	35,8±1,2 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,0157	71,8±1,4 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,0092
Высокое	Самцы	7	2,95±0,12 <i>p</i> = 0,129 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,764 <i>p</i> ₃ = 0,403	4,57±0,16 <i>p</i> = 0,187 <i>p</i> ₁ = 0,0627 <i>p</i> ₂ = 0,640 <i>p</i> ₃ = 0,283	35,4±1,2 <i>p</i> = 0,502 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,795 <i>p</i> ₃ = 0,785	71,1±1,4 <i>p</i> = 0,915 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,718 <i>p</i> ₃ = 0,919
	Самки	7	2,70±0,12 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,0705 <i>p</i> ₃ = 0,674	4,26±0,16 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,320 <i>p</i> ₃ = 0,849	36,6±1,2 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,0340 <i>p</i> ₃ = 0,645	72,7±1,4 <i>p</i> ₁ < 0,0001 <i>p</i> ₂ = 0,0176 <i>p</i> ₃ = 0,961
Фактор пол df = 1			F = 39,82; <i>p</i> _F < 0,0001	F = 34,98; <i>p</i> _F < 0,0001	F = 16,69; <i>p</i> _F = 0,0001	F = 11,22; <i>p</i> _F = 0,0013
Фактор ПЭ df = 3			F = 92,05; <i>p</i> _F < 0,0001	F = 29,91; <i>p</i> _F < 0,0001	F = 174,88; <i>p</i> _F < 0,0001	F = 125,93; <i>p</i> _F < 0,0001
Взаимодействие факторов df = 3			F = 4,03; <i>p</i> _F = 0,0101	F = 3,91; <i>p</i> _F = 0,0117	F = 7,72; <i>p</i> _F = 0,0001	F = 3,11; <i>p</i> _F = 0,031

Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; F — квантиль распределения Фишера-Снедекора; df — число степеней свободы; *p* — указано по отношению к самкам с тем же ПЭ; *p*₁ — по отношению к интактным (нулевое ПЭ) крысам того же пола; *p*₂ — по отношению крысам того же пола с низким ПЭ; *p*₃ — по отношению к крысам того же пола со средним ПЭ; *p*_F — значимость эффективности действия фактора; *n* — число животных в группе.
Note: Arithmetic means and their standard errors are shown; F is the Fisher's-Snedecor's distribution quantile; df is the number of freedom degrees; *p* — indicated in relation to females with the same CET; *p*₁ — in relation to intact (zero CET) rats of the same sex; *p*₂ — in relation to rats of the same sex with low CET; *p*₃ — in relation to rats of the same sex with an average CET; *p*_F is the significance of the effectiveness of the factor; *n* is the number of animals in the group.

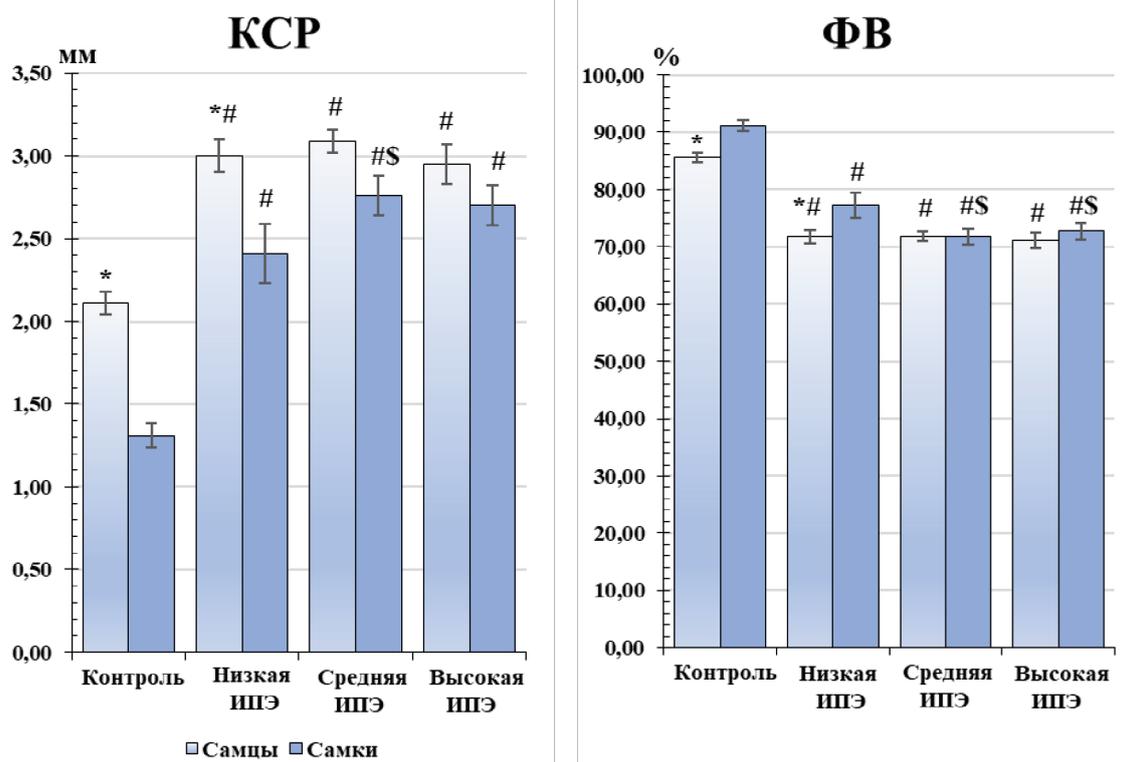


Рис. 4. КСР и ФВ ЛЖ сердца самцов и самок крыс, подвергнутых периодической принудительной алкоголизации в течение 24 недель

Fig. 4. ESD and EF of the left ventricle of male and female rats subjected to periodic forced alcoholization for 24 weeks

Примечания: Контроль — интактные животные; по оси ординат: левая панель — КСР (мм); правая панель — ФВ (%); * — $p < 0,05$ по отношению к самкам такой же подгруппы, # — $p < 0,05$ по отношению к интактным животным того же пола; \$ — $p < 0,05$ по отношению к крысам с низким ИПЭ того же пола; ИПЭ — интенсивность потребления этанола.

Notes: Control — intact animals; along the y-axis: left panel — ESD (mm); right panel — EF (%); * — $p < 0.05$ in relation to females of the same subgroup; # — $p < 0.05$ in relation to intact animals of the same sex; \$ — $p < 0.05$ in relation to rats with low CET of the same sex; ИПЭ — ethanol consumption intensity.

значимо, так же как и у самцов, отличались от таковых, зарегистрированных у интактных животных ($p < 0,0001$).

Ранее мы показали, что у интактных самок, по сравнению с самцами, значительно меньше размеры ЛЖ и выше показатели инотропной функции [11]. В настоящем исследовании эти результаты были подтверждены (табл. 3, рис. 4). Так, например, если у самцов КСР и ФВ были в среднем равны $2,11 \pm 0,07$ мм и $85,6 \pm 0,9$ %, то у самок эти показатели составляли $1,31 \pm 0,07$ мм ($p = 0,0001$) и $91,2 \pm 0,9$ % ($p = 0,0037$), соответственно. Можно предположить, что различия в размерах ЛЖ между самцами и самками в определённой мере связаны с большей массой тела самцов, так как у самок масса тела на протяжении всего эксперимента была значительно меньше, чем у самцов. Так, например, к концу 24-й недели алкоголизации у самок она составляла 343 ± 13 г, а у самцов 537 ± 9 г ($p < 0,0001$). Поскольку у интактных самок по сравнению с самцами ФУ и ФВ, которые не зависят от размеров животного, также были значительно больше, то объяснить поло-

вые различия в размерах ЛЖ только большей массой самцов не представляется возможным.

При анализе изменений геометрии ЛЖ и инотропной функции у крыс в условиях модельных экспериментов, имитирующих «бытовое пьянство», обращает на себя внимание и тот факт, что увеличение КСР и КДР и уменьшение ФУ и ФУ у самок, по сравнению с самцами, более выражены. Особенно эти различия заметны в подгруппах со средним и высоким ИПЭ. Так, у самцов в подгруппе со средним ИПЭ КСР увеличен на 46 %, а ФВ уменьшена на 16 % по сравнению с интактными крысами того же пола. У самок с тем же ИПЭ КСР увеличен на 111 %, а ФВ уменьшена на 21 % (рис. 5).

Ранее на трансляционной модели АКМП в условиях постоянной хронической принудительной алкоголизации мы показали, что у алкоголизированных самок в ткани аорты увеличивается экспрессия мРНК генов α_1 -адренорецепторов и эндотелиновых рецепторов, тогда как у самцов экспрессия мРНК этих генов, напротив, снижается [11]. Исходя из этих данных, можно

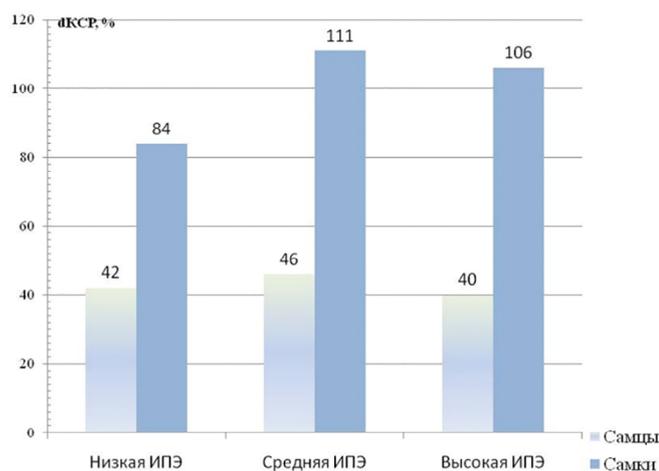


Рис. 5. Увеличение КСР по отношению к интактным животным у самцов и самок крыс, подвергнутых принудительной периодической алкоголизации в течение 24 недель

Fig. 5. An increase in ESD in relation to intact animals in male and female rats subjected to forced periodic alcoholization for 24 weeks

Примечание: по оси ординат увеличение КСР (%); ИПЭ — интенсивность потребления этанола.

Note: along the y-axis, the increase in the ESD (%); ИПЭ — ethanol consumption intensity.

полагать, что у самок крыс в условиях алкоголизации, в отличие от самцов, увеличивается постнагрузка на миокард, что, естественно, способствует усилению тяжести патологического процесса и также может внести свой негативный вклад в ремоделирование левого желудочка сердца.

Заключение / Conclusions

В модельных экспериментах, имитирующих «бытовое пьянство» у крыс обоего пола, согласно данным эхокардиографии, через 24 недели периодического потребления этанола формируется АКМП, характеризующаяся увеличением КСР и КДР левого желудочка сердца и снижением его инотропной функции. У самок интенсивность дилатации левого желудочка сердца и снижение его сократительной функции статистически значимо больше, чем у самцов, что прогностически более неблагоприятно и, по-видимому, определяется выявленными зависимыми от пола разнонаправленными тенденциями в формировании алкогольного поведения с ростом потребления этанола у самок крыс по мере нарастания сроков алкоголизации. Механизмы, лежащие в основе выявленных половых различий кардиотоксического действия алкоголя требуют дальнейшего изучения.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Крыжановский Сергей Александрович

Автор, ответственный за переписку

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

Corresponding author

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

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

Ионова Екатерина ОлеговнаORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>

SPIN-код: 5042-1952

Scopus Author ID: 55507470600

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

Ekaterina O. IonovaORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>

SPIN code: 5042-1952

Junior Research Scientist of Laboratory of Pharmacological Screening FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Барчуков Владимир Валерьевичe-mail: barchukov.pharm@yandex.ruORCID 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. Barchukove-mail: barchukov.pharm@yandex.ruORCID 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 Николаевичe-mail: vns539@yandex.ruORCID 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. Stolyaruke-mail: vns539@yandex.ruORCID 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”, Moscow, Russian Federation

Вититнова Марина Борисовнаe-mail: MB-Vit@yandex.ruORCID 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. Vititnovae-mail: MB-Vit@yandex.ruORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>

SPIN code: 1901-8919

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

Колик Лариса ГеннадьевнаORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>

SPIN-код: 9126-6922

д. б. н., проф. РАН, руководитель лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Larisa G. KolikORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>

SPIN code: 9126-6922

Dr. Sci. (Biol.), Professor RAS, head of the Laboratory of Pharmacological regulation of addiction conditions FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Дурнев Андрей ДмитриевичORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

SPIN-код: 8426-0380

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

Andrei D. DurnevORCID ID: <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, “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Отчёт ВОЗ «Мониторинг здоровья» за 2018 год. [WHO Health Monitoring Report for 2018. (In Russ.)]. URL: <https://www.krasotaimedicina.ru/diseases/narcologic/female-alcoholism>.
2. Ерпылов А.А. Алкоголизм как социальная проблема российского общества. *Теория и практика сервиса: экономика, социальная сфера, технологии*. 2015;26(4):31–34. [Erpilov AA. Alcoholism as a social problem of Russian society. *Theory and practice of service: economy, social sphere, technologies*. 2015;26(4):31–34. (In Russ.)].
3. Москаленко В.Д. Зависимость. Семейная болезнь. 2015. Институт консультирования и системных решений, Москва, с. 1–368. [Moskalenko VD. Dependence. Family illness. 2015. Institute of consulting and system solutions, Moscow, pp. 1–368. (In Russ.)].
4. Семенова В.Г., Антонова О.И., Евдокushина Г.Н., Гаврилова Н.С. Потери населения России в 2000–2008 гг., обусловленные алкоголем: масштабы, структура, тенденции. *Социальные аспекты здоровья населения: электронный научный журнал*. 2010. 01 июля [Электронный ресурс]. [Semenova VG, Antonova OI, Evdokushina GN, Gavrilova NS. Losses of the population of Russia in 2000–2008 caused by alcohol: scales, structure, and tendencies. *Social aspects of population health: an electronic scientific journal*. 2010. 01 July [Electronic resource]. (In Russ.)]. URL: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/188/27>.
5. Никитина С.Ю., Козеева Г.М. Совершенствование статистики смертности от алкоголизма. *Вопросы статистики*. 2006;(11):21–23. [Nikitina SU, Kozeeva GM. Improving statistics on alcohol-related deaths. *Statistics questions*. 2006;(11):21–23. (In Russ.)].
6. Fernández-Solá JI, Estruch R, Nicolás JM, et al. Comparison of alcoholic cardiomyopathy in women versus men. *Am J Cardiol*. 1997;80(4):481–485. (In Russ.)]. DOI: 10.1016/s0002-9149(97)00399-8.
7. Fernández-Solá JI, Nicolás-Arfelis JM. Gender differences in alcoholic cardiomyopathy. *J Gen Specif Med*. 2002;5(1):41–47.
8. Conen D, Tedrow UB, Cook NR, et al. Alcohol consumption and risk of incident atrial fibrillation in women. *JAMA*. 2008 Dec 3;300(21):2489–2496. DOI: 10.1001/jama.2008.755.
9. Pfeiffer D, Jurisch D, Neef M, Hagendorff A. Alkohol und Rhythmusstörungen [Alcohol and arrhythmias]. *Herz*. 2016 Sep;41(6):498–502. German. DOI: 10.1007/s00059-016-4463-z.
10. 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, Kolic LG, Tsorin IB, et al. Alcoholic Cardiomyopathy: Translation Model. *Bull Exp Biol Med*. 2017;163(5):627–631. (In Russ.)]. DOI: 10.1007/s10517-017-3865-0.
11. Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., Ионова Е.О. и др. Гендерные особенности изменений состояния сердечно-сосудистой системы при алкогольной кардиомиопатии (экспериментальное исследование). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019;63(4):23–31. [Kozhevnikova LM, Tsorin IB, Ionova EO, et al. Sex-related changes in the cardiovascular system in alcoholic cardiomyopathy (An experimental study). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy). 2019;63(4):23–31. (In Russ.)]. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.23-3.
12. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б. и др. К возможности использования эхокардиографии для оценки этапов формирования алкогольной кардиомиопатии. *Физиология человека*. 2014;40(1):122–128. [Kryzhanovskii SA, Kolic LG, Tsorin IB, et al. To the potential use of alcoholic cardiomyopathy echocardiography assessment of forming. *Fiziol Cheloveka*. 2014;40(1):122–128. (In Russ.)]. DOI: 10.7868/S013116461401010X/
13. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005 Dec;18(12):1440–1463. DOI: 10.1016/j.echo.2005.10.005.
14. Колик Л.Г., Надорова А.В., Козловская М.М. Эффективность пептидного анксиолитика селанка при моделировании синдрома отмены у крыс с устойчивой алкогольной мотивацией. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014;157(1):52–55. [Kolic LG, Nadorova AV, Kozlovskaya MM. Efficacy of peptide anxiolytic selank during modeling of withdrawal syndrome in rats with stable alcoholic motivation. *Bull Exp Biol Med*. 2014;157(1):52–55. (In Russ.)]. DOI: 10.1007/s10517-014-2490-4.
15. Mittal N, Fleming SM, Martinez A, et al. Sex differences in cognitive performance and alcohol consumption in High Alcohol-Drinking (HAD-1) rats. *Behav Brain Res*. 2020 March 02;381:112456. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112456.
16. Amodeo LR, Wills DN, Sanchez-Alavez M, et al. Intermittent voluntary ethanol consumption combined with ethanol vapor during adolescence increases drinking and alters other behaviors in adulthood in female and male rats. *Alcohol*. 2018;73:57–66. DOI: 10.1016/j.alcohol.2018.04.003.
17. Cailhol S, Mormede P. Sex and strain differences in ethanol drinking: effects of gonadectomy. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 2001;24(4):594–599.
18. Li J., Chen P, Han X, et al. Differences between male and female rats in alcohol drinking, negative affects and neuronal activity after acute and prolonged abstinence. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2019;11(4):163–176.
19. Priddy BM, Carmack SA, Thomas LC, et al. Sex, strain, and estrous cycle influence on alcohol drinking in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2017;152:61–67. DOI: 10.1016/j.pbb.2016.08.001.
20. Lombardo JP, Peck JA. Effects of exposure to polychlorinated biphenyls during different periods of development on ethanol consumption by male and female rats. *Environ Pollut*. 2018 May;236:334–342. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.01.072.
21. Frydenberg H, Flote VG, Larsson IM, et al. Alcohol consumption, endogenous estrogen and mammographic density among premenopausal women. *Breast Cancer Res*. 2015 Aug 7;17(1):103. DOI: 10.1186/s13058-015-0620-1.
22. Boykoff N, Schneekloth TD, Hall-Flavin D, et al. Gender differences in the relationship between depressive symptoms and cravings in alcoholism. *Am J Addict*. 2010;19(4):352–526. DOI: 10.1111/j.1521-0391.2010.00057.x.
23. Abulseoud OA, Karpyak VM, Schneekloth T, et al. A retrospective study of gender differences in depressive symptoms and risk of relapse in patients with alcohol dependence. *Am J Addict*. 2013 Sep-Oct;22(5):437–442. DOI: 10.1111/j.1521-0391.2013.12021.x.
24. Jahng JW, Yoo SB, Ryu V, Lee J-H. Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats. *Int J Devl Neuroscience*. 2012;30(1):47–53. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2011.10.001.
25. Karpyak VM, Geske JR, Hall-Flavin DK, et al. Sex-specific association of depressive disorder and transient emotional states with alcohol consumption in male and female alcoholics. *Drug Alcohol Depend*. 2019 Mar 1;196:31–39. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2018.12.010.

Изучение фармакокинетического профиля лекарственного препарата Гидазепам[®], таблетки, 50 мг в исследовании биоэквивалентности

Баскаков Е. В.¹, Григорьев А. В.², Глобенко А. А.³, Шмелев А. Г.¹, Колмыкова Е. А.¹, Ястребова А. В.², Сидорова А. А.², Капашин А. В.³, Ковчан О. В.³, Башкатова А. И.³, Пасько М. А.³

¹ — ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница», Ярославль, Российская Федерация

² — ООО «ЦКП «Аналитическая Спектрометрия», Санкт-Петербург, Российская Федерация

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

Аннотация. Цель исследования. Изучение фармакокинетики и подтверждение биоэквивалентности препаратов, содержащих гидазепам: Гидазепам[®] (АО «Валента Фарм», Россия) и Гидазепам VIC (ТОО «ВИВА ФАРМ», Республика Казахстан) при однократном приеме 1 таблетки (50 мг) здоровыми добровольцами натощак. Дополнительной целью исследования являлся сравнительный анализ данных о нежелательных явлениях при однократном приеме изучаемых препаратов. **Материал и методы.** Проведено открытое, рандомизированное, перекрестное, двухпериодное с адаптивным дизайном исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности с участием здоровых добровольцев. Отбор образцов крови осуществлялся за 15 мин до приема и через 20 мин, 40 мин, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 3,5 ч, 4 ч, 4,5 ч, 5 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после приема лекарственных препаратов. С помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией определяли концентрацию гидазепам и его метаболита (дезалкилгидазепам) для последующего расчета фармакокинетических показателей. **Результаты исследования.** Гидазепам в составе двух сравниваемых лекарственных препаратов характеризовался быстрой абсорбцией и биотрансформацией с образованием активного метаболита. Препараты исследования обладали эквивалентным фармакокинетическим профилем, поскольку 90 % доверительные интервалы для отношения геометрических средних величин параметров C_{max} и $AUC_{(0-72)}$ не выходили за установленные пределы 80,00–125,00 %. По данным клинико-лабораторного и инструментального наблюдения за время проведения исследования у добровольцев не было зарегистрировано ни одного нежелательного явления. **Заключение.** Сравнимые препараты являются биоэквивалентными и демонстрируют одинаковый профиль переносимости при однократном приеме натощак.

Ключевые слова: гидазепам; фармакокинетика; биоэквивалентность; бензодиазепины

Для цитирования:

Баскаков Е. В., Григорьев А. В., Глобенко А. А., Шмелев А. Г., Колмыкова Е. А., Ястребова А. В., Сидорова А. А., Капашин А. В., Ковчан О. В., Башкатова А. И., Пасько М. А. Изучение фармакокинетического профиля лекарственного препарата Гидазепам[®], таблетки, 50 мг в исследовании биоэквивалентности. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023;(3):94–103. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-94-103>

Поступила: 08.08.2023. **В доработанном виде:** 09.08.2023. **Принята к печати:** 17.08.2023. **Опубликована:** 30.09.2023.

Study of the pharmacokinetic profile of the medicinal product Gidazepam[®], tablets, 50 mg in a bioequivalence study

Evgenii V. Baskakov¹, Alexander V. Grigorev², Alexander A. Globenko³, Anton G. Shmelev¹, Elizaveta A. Kolmykova¹, Alyona V. Yastrebova², Alla A. Sidorova², Alexey V. Kapashin³, Olga V. Kovchan³, Anzhelika I. Bashkatova³, Maksim A. Pasko³

¹ — Yaroslavl regional clinical narcological hospital, Yaroslavl, Russian Federation

² — CSU "Analytical Spectrometry", St. Petersburg, Russian Federation

³ — "Valenta Pharm" JSC, Moscow, Russian Federation

Abstract. Aim. The primary aim of this study was to evaluate the pharmacokinetic parameters and confirm the bioequivalence of drugs containing gidazepam, namely Gidazepam[®] (Valenta Pharm, Russia) and Gidazepam VIC (VIVA Pharm, Republic of Kazakhstan), after a single administration of 1 tablet (50 mg) to healthy volunteers under fasting conditions. The secondary aim was a comparative analysis of safety profiles (adverse events) after a single administration of the studied drugs. **Materials and methods.** An open, randomized, crossover, two-period comparative study of pharmacokinetics and bioequivalence with adaptive design was conducted in healthy volunteers. Blood sampling was performed 15 minutes before and 20 min, 40 min, 1 h, 2 h, 3 h, 3.5 h, 4 h, 4.5 h, 5 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h after drug administration. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was used for the evaluation of gidazepam and its metabolite (desalkylgidazepam) concentration with the subsequent calculation of pharmacokinetic parameters. **Results.** From both formulations, gidazepam was quickly absorbed and biotransformed into an active metabolite. Studied drugs had similar pharmacokinetic profiles, as 90% confidence intervals for the ratio of geometric means for C_{max} and $AUC_{(0-72)}$ were within the bioequivalence acceptance range of 80.00–125.00 %. No adverse events were recorded as a result of clinical, laboratory or instrument evaluations during the study. **Conclusion.** Study drugs are considered bioequivalent and show comparable tolerability after a single administration under fasting conditions.

Keywords: gidazepam; pharmacokinetics; bioequivalence; benzodiazepines

For citations:

Baskakov EV, Grigorev AV, Globenko AA, Shmelev AG, Kolmykova EA, Yastrebova AV, Sidorova AA, Kapashin AV, Kovchan OV, Bashkatova AI, Pasko MA. Study of the pharmacokinetic profile of the medicinal product Gidazepam[®], tablets, 50 mg in a bioequivalence study. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):XX–XX. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-XX-XX>

Received: 08.08.2023. **Revision received:** 09.08.2023. **Accepted:** 17.08.2023. **Published:** 30.09.2023.

Введение / Introduction

Тревожные расстройства широко распространены среди населения развитых стран, где каждый третий человек (33,7 %) на протяжении своей жизни рискует столкнуться с данным состоянием [1]. По данным Европейского союза, ежегодные затраты, связанные с тревожными расстройствами, составляют около 41 миллиарда евро [2]. Среди данной патологии выделяют генерализованное тревожное расстройство, расстройства адаптации, а также целый ряд соматоформных расстройств [3]. Было установлено, что тревожные проявления разной степени выраженности отмечаются у 30–40 % пациентов с неврозами [4]. Ведущим симптомом, который объединяет все перечисленные состояния, является патологическая тревога, которая в отличие от физиологической реакции адаптации к новым условиям, является избыточной, необоснованной для конкретной ситуации, более частой или более продолжительной по своему действию. Пациенты погружаются в свои переживания, стараясь избежать стрессовых факторов, что приводит к значимому снижению качества жизни. Кроме психологического дискомфорта в состоянии тревоги могут отмечаться соматические расстройства в виде кардиалгии, экстрасистолии, тахикардии, лабильности артериального давления, гипергидроза и других проявлений [1–3].

Для подавления или уменьшения проявлений тревоги, беспокойства и эмоциональной напряженности в клинической практике чаще всего применяют препараты бензодиазепинового ряда. Несмотря на их достаточную эффективность в отношении тревожных состояний, большинство лекарственных препаратов данной группы обладают побочными эффектами в виде избыточной седации, развития сонливости и миорелаксации.

Гидазепам, являясь представителем группы бензодиазепинов, сочетает в себе достаточно мощный противотревожный эффект с активирующим, антиастеническим действием и практически лишён описанных недостатков, что позволяет отнести его к «дневным» анксиолитикам, оптимальным для терапии синдрома тревоги в амбулаторных условиях. Это достигается за счёт своеобразного механизма действия гидазепам — его взаимодействия с участками связывания в ГАМК-рецепторе, отличным от таковых для других бензодиазепинов [5].

Цель исследования / Aim — изучение фармакокинетики и подтверждение биоэквивалентности препаратов, содержащих гидазепам: Гидазепам® (АО «Валента Фарм», Россия) и Гидазепам VIC (ТОО «ВИВА ФАРМ», Республика Казахстан) при однократном приёме 1 таблетки (50 мг) здоровыми добровольцами натощак. Дополнительной целью исследования являлся сравнительный анализ данных о нежелательных явлениях при однократном приёме изучаемых препаратов.

Материал и методы / Material and methods

Данное исследование проводилось в соответствии с протоколом, принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, стандартами по Надлежащей Клинической Практике (ICH GCP), а также в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации (РФ) и Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Участие в исследовании являлось добровольным. Доброволец имел право отказаться от участия в проводимом исследовании на любой его стадии. Перед проведением исследования было получено разрешение на проведение клинического исследования Министерства здравоохранения РФ (№ 339 от 05.07.2021 г.) и одобрение локального этического комитета (выписка из протокола №16 от 30.07.2021).

Проведённое исследование являлось открытым, рандомизированным, перекрёстным, сравнительным, двухпериодным и предусматривало адаптивный дизайн. Оценивались фармакокинетические параметры и биоэквивалентность исследуемого препарата (Т) Гидазепам® (АО «Валента Фарм», Россия), таблетки, 50 мг в сравнении с референтным препаратом (R) Гидазепам VIC (ТОО «ВИВА ФАРМ», Республика Казахстан), таблетки, 50 мг у здоровых добровольцев при приёме натощак. Добровольцы были рандомизированы в 2 равные группы по 18 человек в зависимости от последовательности приёма препаратов исследования (Т/R или R/T). Таким образом, в каждом из периодов добровольцы принимали 1 таблетку (50 мг) исследуемого препарата или препарата сравнения в зависимости от того в какую группу они были распределены. Продолжительность наблюдения за концентрацией действующего вещества составила 72 ч. Отмывочный период между приёмами препаратов составил 14 суток. Во втором периоде добровольцы, ранее принимавшие исследуемый препарат, получали препарат сравнения, и наоборот, если в первом периоде добровольцы принимали препарат сравнения, то во втором периоде получали исследуемый препарат.

В исследование включались здоровые добровольцы обоего пола в возрасте от 18 до 45 лет с индексом массы тела (ИМТ) от 18,5 до 30 кг/м² при массе тела не менее 45 кг и не более 100 кг. Отобранные в исследование добровольцы на регулярной основе не принимали лекарственные средства, а также биологически активные добавки, не употребляли алкоголь или наркотики и не выкуривали более 10 сигарет в день. Перед проведением исследования все добровольцы были ознакомлены с планом процедур исследования и подписали информированное согласие. Среди других критериев включения были: отрицательный тест на беременность для женщин, а также согласие применять барьерные методы контрацепции на протяжении всего периода исследования и в течение 30 дней после его окончания.

Основными критериями невключения являлись: известная гиперчувствительность к гизазепаму или вспомогательным веществам изучаемых препаратов; отягощённый аллергологический анамнез; острые или хронические заболевания, включая психические расстройства или судорожные приступы в настоящее время или в анамнезе; непереносимость лактозы, дефицит лактазы, синдром глюкозо-галактозной мальабсорбции; употребление цитрусовых, клюквы и других продуктов, способных оказать влияние на фармакокинетические параметры препаратов за 14 дней до начала исследования; систолическое АД менее 100 мм рт. ст. и более 130 мм рт. ст., диастолическое АД менее 70 мм рт. ст. и более 90 мм рт. ст.; ЧСС менее 60 уд/мин и более 80 уд/мин в покое; депо-инъекции или применение имплантатов любых других лекарственных препаратов за 3 месяца до начала исследования; острые инфекционные заболевания менее чем за 4 недели до начала исследования; приём препаратов, влияющих на ферменты цитохрома P450 и функцию печени (барбитуратов, омепразола, препаратов зверобоя продырявленного и т. д.), менее чем за 2 месяца до начала исследования; участие в другом клиническом исследовании менее чем за 3 месяца до процедуры скрининга. Донорство крови менее чем за 2 месяца до начала исследования также являлось критерием невключения. При выявлении любых отклонений от норм регистрируемых показателей на этапе скрининга доброволец не включался в исследование.

Общая продолжительность исследования для каждого добровольца составляла не более 27 суток. Исследование включало в себя: скрининг (Визит 0, до 10 суток), I период (Визит 1, 3 суток, включая период оценки фармакокинетического профиля продолжительностью 72 ч), период отмывки, который начинался сразу после первого приёма препаратов (14 суток), II период (Визит 2, 3 суток, включая период оценки фармакокинетического профиля продолжительностью 72 ч).

Сравниваемые препараты принимали внутрь натощак, однократно в дозе 50 мг. Отбор крови в каждый из периодов исследования осуществляли за 15 мин до приёма и через 20 мин, 40 мин, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 3,5 ч, 4 ч, 4,5 ч, 5 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после приёма лекарственных препаратов. Таким образом, в каждом из периодов производился отбор 16 проб крови по 5 мл каждая. Дополнительно на этапе скрининга, а также в начале второго периода и при завершении исследования отбирали образцы крови по 10 мл для проведения биохимического и общего анализов крови с целью оценки безопасности.

Промежуток времени между отбором крови и её обработкой не превышал 20 мин. Плазму крови отделяли центрифугированием при температуре +4 °С в течение 15 мин при 3000 оборотов в минуту. После получения плазмы она разделялась на 2 аликвоты объёмом не менее 0,8–1,0 мл, которые замораживали и хранили при температуре не выше –70 °С.

Концентрацию гизазепама и его метаболита (дезалкилгизазепама) в полученной плазме определяли при помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Для извлечения аналита из плазмы использовали процедуру жидкость–жидкостной экстракции. Степень извлечения гизазепама составила $64 \pm 7\%$, гизазепама-d5 (внутренний стандарт) — $69 \pm 5\%$, дезалкилгизазепама — $85 \pm 7\%$, дезалкилгизазепама-d5 (внутренний стандарт) — $79 \pm 8\%$. Биоаналитический метод был валидирован по следующим характеристикам: селективность, нижний предел количественного определения (НПКО), линейный диапазон, эффект переноса, прецизионность, правильность, степень извлечения, матричный эффект, стабильность в различных условиях, исследование возможности разбавления. НПКО гизазепама составил 10 нг/мл, при линейном диапазоне метода 10–1000 нг/мл. Для дезалкилгизазепама НПКО составил 4 нг/мл, а линейный диапазон — 4–500 нг/мл.

Расчёт фармакокинетических параметров гизазепама выполняли на основе его концентрации, измеренной у добровольцев, полностью завершивших исследование. Использовался метод некомпартментного анализа, который предусматривал расчёт параметров фармакокинетики без каких-либо предположений о компартментах и проводился в программной среде Kinetica 5.1. Рассчитывались следующие показатели: площадь под фармакокинетической кривой «плазменная концентрация — время» от начального момента времени до 72 ч после введения ($AUC_{(0-72)}$), максимальная концентрация в плазме крови (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (t_{max}), период полувыведения ($t_{1/2}$), относительная биодоступность (F [$AUC_{(0-72)}T/AUC_{(0-72)}R$]) и относительная степень всасывания (F [$C_{max}T/C_{max}R$]).

Статистические расчёты выполняли при помощи программного обеспечения NCSS 11.0. Для демографических и антропометрических данных, витальных показателей, данных лабораторных анализов рассчитывали показатели описательной статистики: среднее, стандартное отклонение (SD), медиану, минимум, максимум. Дисперсионный анализ (ANOVA) фармакокинетических параметров проводился на основе предположения о логнормальном распределении величин AUC и C_{max} , которые включались в ANOVA после лог-преобразования. В результате проведённого дисперсионного анализа получали 90 % доверительные интервалы (ДИ) для отношения геометрических средних параметров $AUC_{(0-t)}$ и C_{max} , а также коэффициенты межиндивидуальной и внутрииндивидуальной вариации этих параметров.

Сравнение полученных параметров для тестирования гипотезы о биоэквивалентности проводилось на основе мультипликативной модели, а доверительные интервалы строили для отношений соответствующих средних значений. Вывод о биоэквивалентности

сравниваемых препаратов основывался на оценке 90 % доверительных интервалов для отношения геометрических средних параметров $AUC_{(0-t)}$ и C_{max} . Препараты считались биоэквивалентными, если границы оценённого доверительного интервала для $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ находились в пределах 80,00–125,00 %.

Для оценки безопасности регистрировали жизненные показатели, проводили физикальный осмотр и лабораторное обследование, снимали электрокардиограмму (ЭКГ), регистрировали и анализировали все нежелательные явления (НЯ), включая серьёзные нежелательные явления (СНЯ).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Процедуры скрининга прошли 40 добровольцев, из которых 36 человек были рандомизированы для участия в исследовании. Средний возраст включённых в исследование добровольцев составил 27,4 лет (19–44), рост — 175,4 см, ИМТ — 24 кг/м². Среди рандомизированных добровольцев было 11 (30,56 %) женщин и 25 (69,44 %) мужчин, 34 (94,44 %) добровольца принадлежали к европеоидной расе и 2 — к азиатской (5,56 %).

Усреднённые кривые зависимости «плазменная концентрация — время» для гидазепама в обычном и полулогарифмическом виде представлены на рисунках 1 и 2. Были рассчитаны средние значения основного параметра, характеризующего биодоступность действующего вещества из лекарственной формы — $AUC_{(0-72)}$.

Для исследуемого препарата данный показатель составил ($M \pm SD$) 2511 ± 720 нг·ч/мл (диапазон от 1134 до 5253 нг·ч/мл), а для референтного — 2463 ± 709 нг·ч/мл (диапазон от 1199 до 4176 нг·ч/мл).

Рассчитанные средние значения ($M \pm SD$) $AUC_{(0-\infty)}$ гидазепама для исследуемого и референтного препаратов составили 2712 ± 758 нг·ч/мл (диапазон от 1267 до 5389 нг·ч/мл) и 2663 ± 755 нг·ч/мл (диапазон от 1337 до 4480 нг·ч/мл), соответственно.

Средние значения ($M \pm SD$) C_{max} гидазепама, определяемой в плазме крови добровольцев при приёме исследуемого препарата составили 385 ± 101 нг/мл (диапазон от 214 до 720 нг/мл), а для референтного препарата — 395 ± 140 нг/мл (диапазон от 210 до 768 нг/мл).

Средние значения ($M \pm SD$) $t_{1/2}$ гидазепама для исследуемого и референтного препаратов составили $6,445 \pm 1,644$ ч и $6,321 \pm 1,666$ ч, соответственно. Показатель λ_z — $0,115 \pm 0,033$ ч⁻¹ и $0,12 \pm 0,048$ ч⁻¹, соответственно.

Значения медианы t_{max} гидазепама для тестируемого и референтного препаратов составили 1,5 и 2 ч, соответственно.

Также были изучены фармакокинетические параметры дезалкилгидазепама после однократного приёма исследуемых препаратов. Усреднённые кривые зависимости «плазменная концентрация — время» для дезалкилгидазепама в обычном и полулогарифмическом виде графически представлены на рисунках 3 и 4. Средние значения ($M \pm SD$) $AUC_{(0-72)}$ дезалкилгидазепама

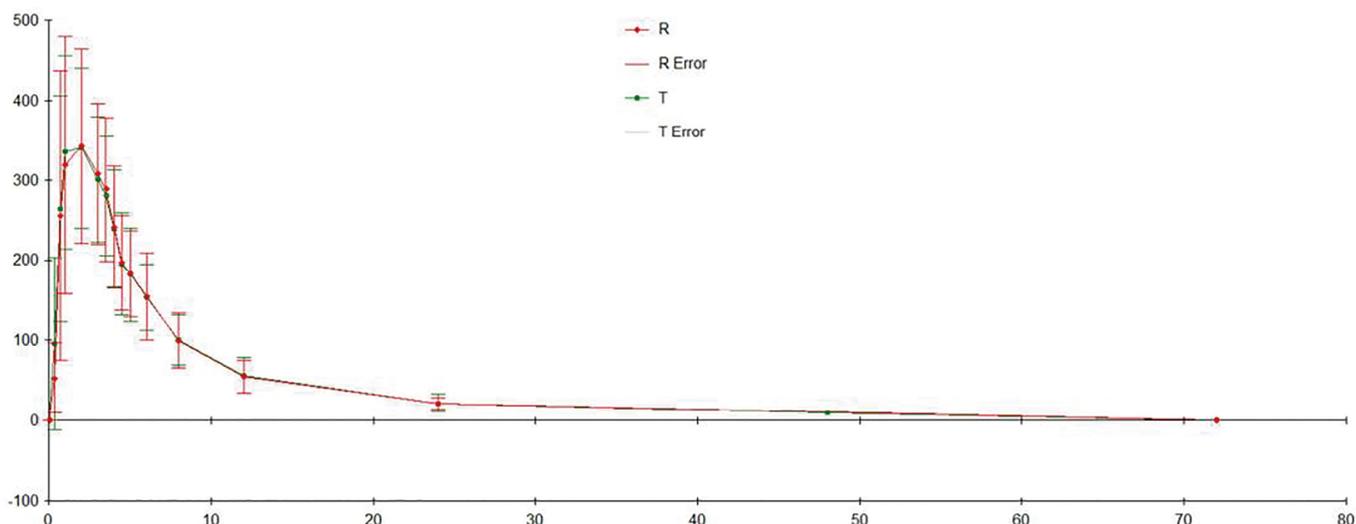


Рис. 1. Усреднённая кривая зависимости «плазменная концентрация — время» гидазепама в плазме крови добровольцев после приёма тестируемого (Т) и референтного (R) препаратов в линейных координатах

Fig. 1. Averaged curve of the dependence "plasma concentration — time" of gidazepam in the blood plasma of volunteers after taking the test drug (T) and the reference drug (R) in linear coordinates

Примечания: по оси абсцисс — время после приёма препарата; по оси ординат — измеренная концентрация гидазепама в нг/мл; Error — среднеквадратическое отклонение.

Notes: on the abscissa axis — the time after taking the drug; on the ordinate axis, the measured concentration of gidazepam in ng / ml; Error — the standard deviation.

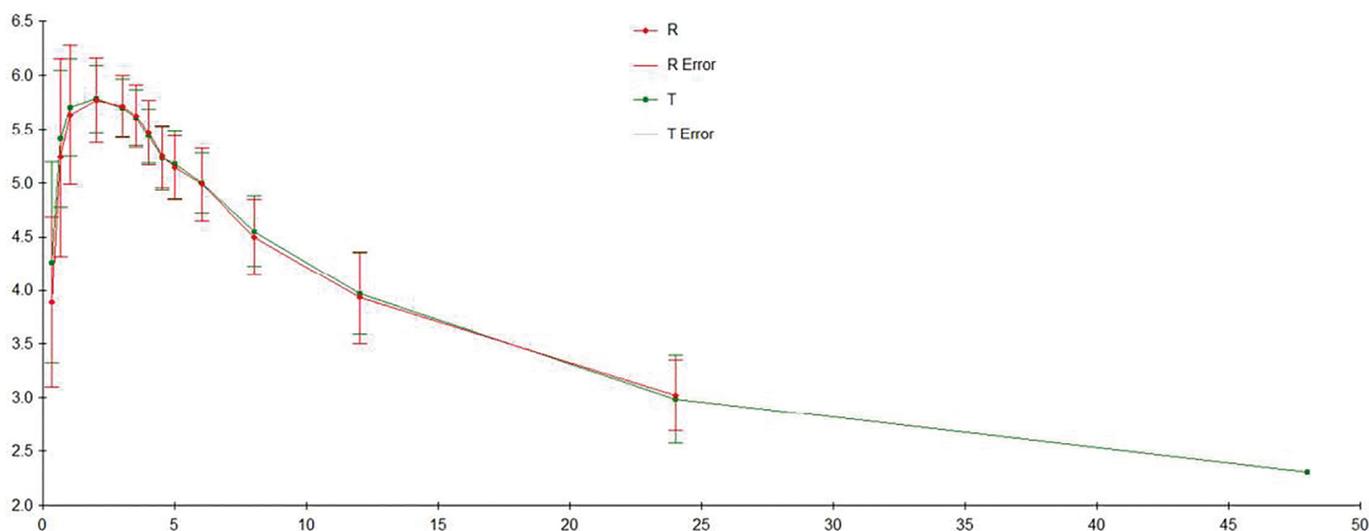


Рис. 2. Усреднённая кривая зависимости «плазменная концентрация — время» гИдазепам в плазме крови добровольцев после приёма тестируемого (Т) и референтного (R) препаратов в полулогарифмических координатах

Fig. 2. The averaged curve of the dependence "plasma concentration — time" of gidazepam in the blood plasma of volunteers after taking the test drug (T) and the reference drug (R) in semi-logarithmic coordinates

Примечания: по оси абсцисс — время после приёма препарата; по оси ординат — лог-преобразованная концентрация гИдазепам в нг/мл; Error — среднеквадратическое отклонение.

Notes: on the abscissa axis — the time after taking the drug; on the ordinate axis — the converted concentration of gidazepam in ng / ml; Error — the standard deviation.

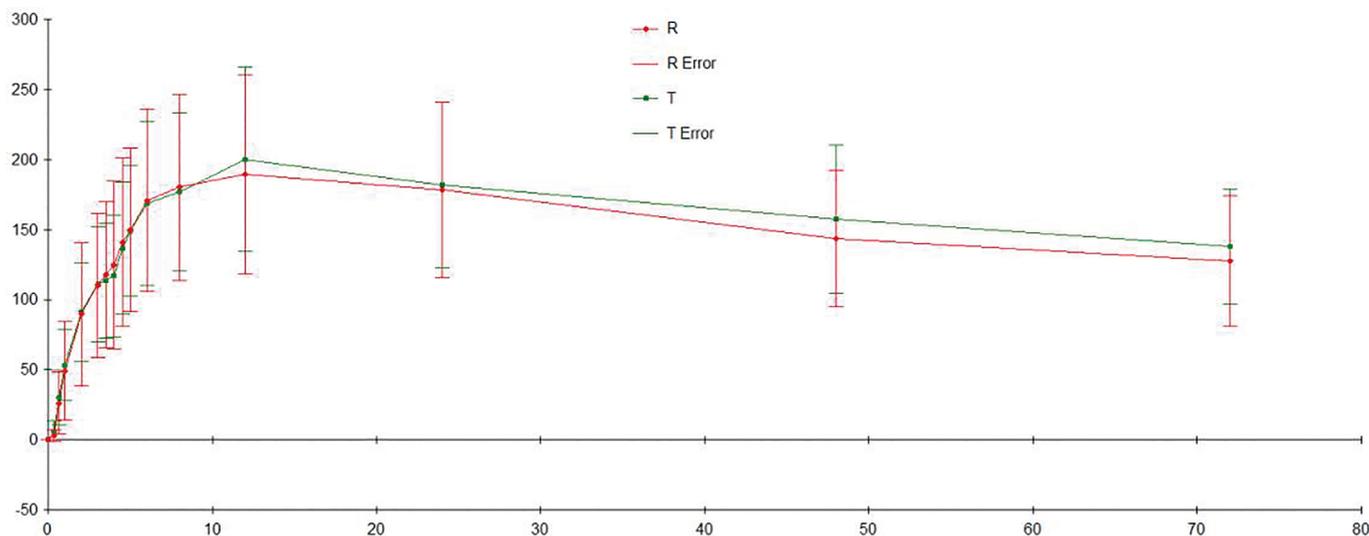


Рис. 3. Усреднённая кривая зависимости «плазменная концентрация — время» дезалкилгИдазепам в плазме крови добровольцев после приёма тестируемого (Т) и референтного (R) препаратов в линейных координатах

Fig. 3. Averaged dependence curve "plasma concentration — time" of disalkylhidazepam in the blood plasma of volunteers after taking the test drug (T) and the reference drug (R) in linear coordinates

Примечания: по оси абсцисс — время после приёма препарата; по оси ординат — измеренная концентрация дезалкилгИдазепам в нг/мл; Error — среднеквадратическое отклонение.

Notes: on the abscissa axis — the time after taking the drug; on the ordinate axis — the measured concentration of disalkylgidazepam in ng / ml; Error — the standard deviation.

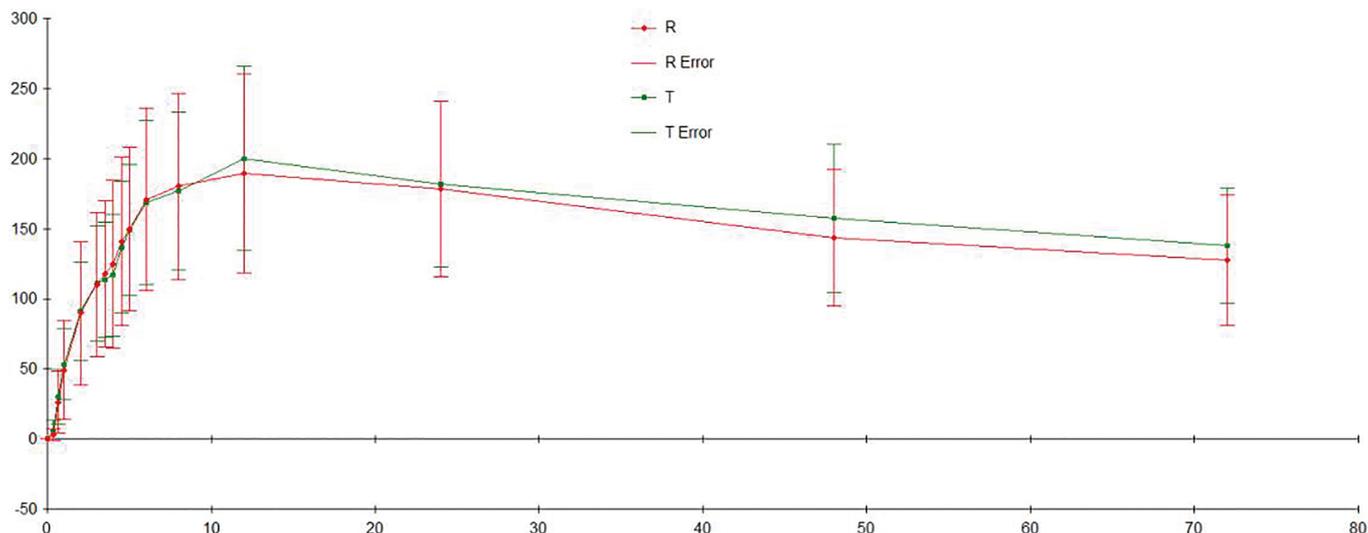


Рис. 4. Усреднённая кривая зависимости «плазменная концентрация — время» дезалкилгидазепама в плазме крови добровольцев после приёма тестируемого (Т) и референтного (R) препаратов в полулогарифмических координатах

Fig. 4. Averaged dependence curve "plasma concentration — time" of disalkylhidazepam in the blood plasma of volunteers after taking the test drug (Т) and the reference drug (R) in semi-logarithmic coordinates

Примечания: по оси абсцисс — время после приёма препарата; по оси ординат — лог-преобразованная концентрация дезалкилгидазепама в нг/мл; Error — среднее квадратическое отклонение.

Notes: on the abscissa axis — the time after taking the drug; on the ordinate axis — the converted concentration of disalkylgidazepam in ng / ml; Error — the standard deviation.

зепама для исследуемого и референтного препаратов составили 11604 ± 3329 нг·ч/мл (диапазон от 2889 до 16621 нг·ч/мл) и 11015 ± 3631 нг·ч/мл (диапазон от 3076 до 17475 нг·ч/мл), соответственно.

Рассчитанные средние значения ($M \pm SD$) параметра $AUC_{(0-\infty)}$ дезалкилгидазепама для исследуемого препарата составили 39890 ± 24417 нг·ч/мл (диапазон от 11740 до 115488 нг·ч/мл), для препарата сравнения — 39002 ± 31933 нг·ч/мл (диапазон от 10789 до 166507 нг·ч/мл), соответственно.

Средние значения ($M \pm SD$) C_{max} дезалкилгидазепама после однократного приёма исследуемого препарата составили 211 ± 65 нг/мл (диапазон от 51 до 355 нг/мл), для референтного препарата — 204 ± 73 нг/мл (диапазон от 61 до 385 нг/мл).

Показатели средних значений ($M \pm SD$) $t_{1/2}$ дезалкилгидазепама для исследуемого и референтного препарата составили $145,9 \pm 151,5$ ч и $140,0 \pm 108,7$ ч, соответственно. Показатель λz составил $0,008 \pm 0,004$ ч⁻¹ для исследуемого и $0,008 \pm 0,005$ ч⁻¹ для референтного препаратов.

Также было определено значение t_{max} (медиана) для дезалкилгидазепама, которое для обоих препаратов было идентично и составило 12 ч.

Полученные границы для 90 % ДИ отношения геометрических средних значений параметров $AUC_{(0-t)}$ и C_{max} представлены в табл. 1.

В соответствии с результатами исследования было установлено, что границы 90 % ДИ для отношения (Т/R) геометрических средних параметра $AUC_{(0-72)}$ и

Таблица 1

Границы 90 % доверительного интервала для оцениваемых показателей фармакокинетики

Вещество	Параметр	Отношение средних значений [R/T], % (90 % доверительный интервал)	Мощность теста	CV _{intra}
Гидазепам	$AUC_{(0-t)}$	102,27 (96,69–108,16)	0,9992	0,141355
	C_{max}	99,9 (92,81–107,53)	> 0,9999	0,186238
Дезалкилгидазепам	$AUC_{(0-t)}$	106,39 (100,71–112,38)	> 0,9999	0,138166
	C_{max}	103,9 (97,03–111,26)	> 0,9999	0,172942

C_{max} не выходили за установленные для биоэквивалентности пределы, составляющие от 80,00 до 125,00 % при достижении 80 % мощности теста как для гидазепама, так и для его активного метаболита. Таким образом, тестируемый лекарственный препарат Гидазепам[®], таблетки, 50 мг (АО «Валента Фарм», Россия) и Гидазепам VIC, таблетки, 50 мг (ТОО «ВИВА ФАРМ», Республика Казахстан) являются биоэквивалентными.

В ходе исследования НЯ зарегистрированы не были. По данным физикального осмотра, динамики основных жизненных показателей (АД, ЧСС, температуры тела), общеклинического анализа крови и мочи, а также результатов интерпретации ЭКГ отклонений не определялось. На основании этого исследователи сделали вывод о сопоставимом спектре безопасности сравниваемых препаратов.

Обсуждение / Discussion

Разработка препаратов бензодиазепинового ряда началась с середины 50-х годов прошлого столетия. Первым представителем новой группы лекарственных веществ стал препарат хлордиазепоксид, который в 1960 г. был зарегистрирован под торговым названием Librium. В сравнении с ранее синтезированными антипсихотическими и седативными препаратами того времени, такими как хлорпромазин, мепробамат и фенобарбитал, новый препарат обладал достаточно уникальным сочетанием фармакологических эффектов. В проведённых тестах хлордиазепоксид был намного эффективнее мепробамата; в 2 из 6 тестов оказывал менее выраженный миорелаксирующий эффект по сравнению с хлорпромазином, обладал равным миорелаксирующим действием в экспериментах на кошках и более выраженной противосудорожной активностью в опытах на мышах; в сравнении с фенобарбиталом его отличал более широкий терапевтический диапазон доз. В последующем были синтезированы такие представители бензодиазепинового ряда, как диазепам, оксазепам, флуразепам и другие. Несмотря на эффективность данных препаратов в отношении купирования тревожных расстройств, вскоре после начала массового использования была выявлена их способность вызывать лекарственную зависимость, что ограничило длительность их курсового применения. Стоит отметить, что в отличие от селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС), при назначении которых анксиолитический эффект развивается лишь к концу второй — началу третьей недели от начала лечения, приём бензодиазепинов приводит к быстрому фармакологическому ответу, что позволяет в короткие сроки уменьшить проявления тревоги. В связи с этим их применение целесообразно короткими курсами для быстрого купирования симптомов [6–7].

Работы по созданию гидазепама проводились в СССР в Физико-химическом институте им. А. В. Богатского. Особенность разработанной молекулы заключалась в её особом взаимодействии с ГАМК-рецепторами и формированием ГАМК-бензодиазепин-рецепторного комплекса при отсутствии влияния на ионофор Cl^- . Благодаря этим особенностям гидазепам обладает выраженным анксиолитическим действием при минимальном седативном и миорелаксирующем эффекте в сочетании со психостимулирующим влиянием на центральную нервную систему. Эти особенности позволяют отнести гидазепам к «дневным» анксиолитикам, что выгодно отличает его от других представителей группы бензодиазепинов [7]. В организме животных и человека гидазепам подвергается биотрансформации с образованием дезалкильного метаболита (дезалкилгидазепама), которому присущи все основные фармакодинамические эффекты исходной молекулы [8–9]. Гидазепам применяют для лечения психических расстройств, характеризующихся тревогой или страхом (тревожное расстройство), а также состояний после длительного употребления алкогольных напитков (абстинентный алкогольный синдром) у взрослых пациентов. Проведённое исследование подтвердило особенность фармакокинетики гидазепама, заключающуюся в быстрой абсорбции действующего вещества, в дальнейшем подвергающегося биотрансформации в активный метаболит и низкой скорости элиминации последнего [7]. Было показано, что дезалкилгидазепам в течение длительного времени удерживается в организме ($t_{1/2}$ составил $145,9 \pm 151,5$ ч и $140,0 \pm 108,7$ ч для исследуемого и референтного препаратов, соответственно), при том, что $t_{1/2}$ гидазепама в среднем составляет около 6 ч, а медиана t_{max} находится в диапазоне 1,5–2 ч.

Заключение / Conclusion

На основании измерения концентрации гидазепама и его метаболита после приёма сравниваемых препаратов было установлено, что 90 % доверительные интервалы для отношения геометрически средних величин параметров C_{max} и $AUC_{(0-72)}$ не выходят за установленные пределы 80,00–125,00 %. Таким образом, изучаемые препараты Гидазепам[®] (АО «Валента Фарм», Россия), таблетки, 50 мг и Гидазепам VIC (ТОО «ВИВА ФАРМ», Республика Казахстан), таблетки, 50 мг являются биоэквивалентными.

В проведённом исследовании не было зарегистрировано ни одного нежелательного явления, что свидетельствует о хорошей переносимости и сопоставимом профиле безопасности.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. Глобенко А. А., Капашин А. В. — концепция и дизайн исследования; Баскаков Е. В., Шмелев А. Г., Колмыкова Е. А., Григорьев А. В., Сидорова А. А., Ястребова А. В. — 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; Baskakov EV, Shmelev AG, Kalmykova EA, Grigorev AV, Sidorova AA, Yastrebina AV — data collection and statistical processing; Pasko MA, Kapashin AV — writing the manuscript; Kovchan OV, Bashkatova AI — editing.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS**Баскаков Евгений Валерьевич**

e-mail: addiction_minus@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8415-1882>
Заместитель главного врача по клинико-экспертной работе, врач психиатр-нарколог ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница», Ярославль, Российская Федерация

Evgenii V. Baskakov

e-mail: addiction_minus@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8415-1882>
Deputy chief medical officer for clinical and expert work, psychiatrist-narcologist, Yaroslavl regional clinical narcological hospital, Yaroslavl, Russian Federation

Григорьев Александр Викторович

e-mail: a.grigoriev@csuas.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0327-8644>
Генеральный директор ООО «ЦКП «Аналитическая Спектрометрия», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Alexander V. Grigorev

e-mail: a.grigoriev@csuas.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0327-8644>
General Director, CSU “Analytical Spectrometry”, St. Petersburg, 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

Шмелев Антон Геннадьевич

e-mail: yaoknb.shmelev@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0009-6117-9810>
Заместитель главного врача по медицинской части, врач психиатр-нарколог ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница», Ярославль, Российская Федерация

Anton G. Shmelev

e-mail: yaoknb.shmelev@yandex.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0009-6117-9810>
Deputy chief medical officer for medical work, psychiatrist-narcologist, Yaroslavl regional clinical narcological hospital, Yaroslavl, Russian Federation

Колмыкова Елизавета Андрияновна

e-mail: tomiko@bk.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0001-5308-1591>

Врач психиатр-нарколог ГБУЗ ЯО

«Ярославская областная клиническая
наркологическая больница», Ярославль,
Российская Федерация**Elizaveta A. Kolmykova**

e-mail: tomiko@bk.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0001-5308-1591>Psychiatrist-narcologist, Yaroslavl regional clinical
narcological hospital, Yaroslavl, Russian Federation**Ястебова Алена Викторовна**

e-mail: a.piven@csuas.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0673-8025>с. н. с. ООО «ЦКП «Аналитическая
Спектрометрия», Санкт-Петербург, Российская
Федерация**Alyona V. Yastrebova**

e-mail: a.piven@csuas.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0673-8025>Senior research associate, CSU “Analytical Spec-
trometry”, St. Petersburg, Russian Federation**Сидорова Алла Анатольевна**

e-mail: a.sidorova@csuas.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5022-0480>Заведующая лабораторией ООО «ЦКП
«Аналитическая Спектрометрия», Санкт-
Петербург, Россия**Alla A. Sidorova**

e-mail: a.sidorova@csuas.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5022-0480>Laboratory Head, CSU “Analytical Spectrometry”,
St. Petersburg, Russian Federation**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**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 dossi-
ers, “Valenta Pharm” JSC, Moscow, Russian Federa-
tion**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**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 analy-
sis of the clinical trial documents and registration
dossiers, “Valenta Pharm” JSC, Moscow, Russian
Federation**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**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

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

Список литературы / References

1. Чутко Л. С., Сурушкина С. Ю., Яковенко Е. А., Чердниченко Д. В. Неврологические аспекты тревожных расстройств. *Медицинский алфавит*. 2022;(10):7–11. [Chutko LS, Yakovenko EA, Surushkina SYu, Cherednichenko DV. Neurological aspects of anxiety disorders. *Medical alphabet*. 2022;(10):7–11. (In Russ.)]. DOI: 10.33667/2078-5631-2022-10-7-11.
2. Бобров А.Е., Усатенко Е.В. Концепция тревожных расстройств: основные тенденции развития. *Социальная и клиническая психиатрия*. 2021;31(4):62–70. [Bobrov AE, Usatenko EV. The concept of anxiety disorders: main development trends. *Social and clinical psychiatry*. 2021;31(4):62–70 (In Russ.)].
3. Девликамова Ф.И., Хайбуллина Д.Х., Максимов Ю.Н., Кадырова Л.Р. Тревожные расстройства в общей клинической практике. *Медицинский совет*. 2023;17(6):95–102. [Devlikamova FI, Khaibullina DH, Maksimov YuN, Kadyrova LR. Anxiety disorders in general clinical practice. *Meditsinskiy Sovet*. 2023;17(6):95–102. (In Russ.)]. DOI: 10.21518/ms2023-094.
4. Зарипова Г.Р., Гарипова Ю.А., Зарудий Ф.А., Юлдашев В.Л. Современное состояние проблемы фармакотерапевтической коррекции психосоматических расстройств. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2010;5(6):127–132. [Zaripova GR, Garipova JA, Zarudij FS, Yuldashev VL. Contemporary state of problem of pharmaceutical correction in psychosomatic disorders. *Bashkortostan medical journal = Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2010;5(6):127–132. (In Russ.)].
5. Korkhov VM, Tkachuk NA, Makan SY, et al. Affinities of gidazepam and its analogs for mitochondrial benzodiazepine receptors. *J Recept Signal Transduct Res*. 2002 Feb-Nov;22(1-4):411–420. DOI: 10.1081/rrs-120014610.
6. Sternbach LH. The benzodiazepine story. *J Med Chem*. 1979 Jan;22(1):1-7. DOI: 10.1021/jm00187a001.
7. Бурчинский С.Г. Роль и место бензодиазепинов в фармакотерапии посттравматического стрессового расстройства. *Международный неврологический журнал*. 2018; 4(98):68–74. [Burchinsky SG. Role and place of benzodiazepines in pharmacotherapy of posttraumatic stress disorder. *International Neurological Journal*. 2018;98(4):68–74. (In Russ.)]. DOI: 10.22141/2224-0713.4.98.2018.139428.
8. Andronati SA, Zin'kovskii VG, Totrova MIu, et al. Biokinetics of a new prodrug gidazepam and its metabolite. *Biull Eksp Biol Med*. 1992 Jan;113(1):45–47.
9. Колыванов Г.Б. Роль фармакокинетических исследований в оптимизации лекарственных форм препаратов с анксиолитическим действием. Автореферат. 2004. Москва. [Kolyvanov GB. Role of pharmacokinetic studies in optimization of dosage forms of drugs with anxiolytic action. Published summary of a dissertation. 2004. Moscow. (In Russ.)]. URL: https://new-disser.ru/_avtoreferats/01002638230.pdf