

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

ФАРМАКО *кинетика и* динамика

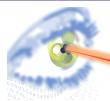
*Включен в перечень рецензируемых
научных журналов ВАК РФ*



№2.2024

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№2
2024



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

Дорофеев Владимир Львович

д. фарм. 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

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@mail.ru

сайт: www.izdat-oki.ru

Жук Елена Владимировна

Дизайн и верстка

e-mail: elenazuk70@mail.ru

Подписано в печать 30.06.2024 г. Тираж 400 экз.

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

115093, г. Москва, Партизанский 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» — подписной индекс 44072

Сайт журнала: www.PharmacoKinetic.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

www.HealthEconomics.ru
www.izdat-Oki

Журналы

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

WEB-порталы

Центр Фармакоэкономических Исследований
Издательство ОКИ

СОДЕРЖАНИЕ

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Исследование фармакокинетических параметров и безопасности лекарственного препарата Дуоника® после приёма пищи в сравнении с оригинальной комбинацией доксиламина и пиридоксина

Шохин И. Е., Носков С. М., Глобенко А. А., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Паруля О. М., Луцкова Л. Н., Капашин А. В., Пасько М. А.

3

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Возможные подходы к воспроизведению эндотелиальной дисфункции. Поиск оптимальной модели

Цорин И. Б., Кожевникова Л. М., Симоненко С. А., Суханова И. Ф., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А.

12

Экспериментальное изучение противовоспалительной активности диклофенака в сверхмалых дозах на модели острого каррагенинового воспаления (рабочая гипотеза)

Махмудова О. А., Авхадиева Г. Ф., Хазиахметова В. Н., Никитин Д. О., Семина И. И.

20

Синдром «Праздничное сердце» у крыс: особенности микроциркуляции, функционального состояния и анатомии сердца

Крыжановский С. А., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Вититнова М. Б., Симоненко С. А., Колик Л. Г.

26

Особенности поведения крыс Вистар на моделях расстройств аутистического спектра, вызванных пренатальным или постнатальным введением вальпроата натрия

Савинкова Е. В., Капица И. Г., Воронина Т. А.

34

Микроциркуляция крови в условиях трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии у крыс

Крыжановский С. А., Цорин И. Б., Ионова Е. О.,

Симоненко С. А., Вититнова М. Б.

43

Экспериментальная модель расстройств аутистического спектра, вызванная пренатальным введением пропионовой кислоты крысам Вистар

Бояркин В. С., Капица И. Г., Воронина Т. А.

50

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Фармакокинетика потенциального

противоэпилептического средства ГИЖ-298

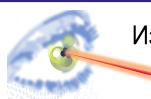
у крыс после различных режимов дозирования

Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Кравцова О. Ю.,

Грибакина О. Г., Жердев В. П.

57

СОДЕРЖАНИЕ



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

Vladimir L. Dorofeev

Ph.D., Professor, Moscow

Andrey D. Durnev

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

Georgy 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

Alexander A. Spasov

Academician RAS, Ph.D.,
Professor, Moscow

Alex K. Starodubtcev

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 30.06.2024. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com

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

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiiskay, 8 Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies
Tel./Fax: + 7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Website: www.PharmacoKinetic.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

www.HealthEconomics.ru

www.izdat-Oki.ru

Journals

[Antibiotics and Chemotherapy](http://www.Antibiotics-and-Chemotherapy.ru)

[Good Clinical Practice](http://www.GoodClinicalPractice.ru)

[Real-World Data & Evidence](http://www.Real-World-Data-and-Evidence.ru)

[Patient-Oriented Medicine and Pharmacy](http://www.Patient-Oriented-Medicine-and-Pharmacy.ru)

[Pharmacogenetics and Pharmacogenomics](http://www.Pharmacogenetics-and-Pharmacogenomics.ru)

WEB-portals

[Center of Pharmacoeconomics Research](http://www.Center-of-Pharmacoeconomics-Research.ru)

Publisher OKI

CLINICAL PHARMACOKINETICS

Study of pharmacokinetic parameters and safety of the drug Duonica® in comparison with the original combination of doxylamine and pyridoxine under fed conditions

Shohin IE, Noskov SM, Globenko AA, Bagaeva NS,
Karnakova KK, Parulya OM, Lutskova LN, Kapashin AV,

Pasko MA 3

PRECLINICAL PHARMACODYNAMIC STUDIES

Possible approaches to reproduction of endothelial dysfunction. searching for the optimal model

Tsorin IB, Kozhevnikova LM, Simonenko SA, Suhanova IF,
Vititnova MB, Kryzhanovskii SA 12

Experimental study of the anti-inflammatory activity of diclofenac in ultra-low doses on a model of acute carrageenan inflammation

Makhmudova OA, Avkhadieva GF, Khaziakhmetova VN,
Nikitin DO, Semina II 20

“Holiday heart” syndrome in rats: Features of microcirculation, functional state and anatomy of the heart

Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Ionova EO, Vititnova MB,
Simonenko SA, Kolik LG 26

Behavioral features of Wistar rats in models of autism spectrum disorders induced by prenatal or postnatal administration of sodium valproate

Savinkova EV, Kapitsa IG, Voronina TA 34

Blood microcirculation under conditions of a translational model of alcohol cardiomyopathy in rats

Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Ionova EO, Simonenko SA,
Vititnova MB 43

Experimental model of autism spectrum disorder induced by prenatal administration of propionic acid to Wistar rats

Boyarkin VS, Kapitsa IG, Voronina TA 50

PRECLINICAL PHARMACOKINETIC STUDIES

Pharmacokinetics of a potential antiepileptic drug GlZh-298

Kolyvanov GB, Litvin AA, Kravtsova OYu, Gribakina OG,
Zherdev VP 57



Исследование фармакокинетических параметров и безопасности лекарственного препарата Дуоника® после приёма пищи в сравнении с оригинальной комбинацией доксиламина и пиридоксина

Шохин И. Е.¹, Носков С. М.^{2,3}, Глобенко А. А.⁴, Багаева Н. С.¹, Карнакова К. К.¹,
Паруля О. М.², Луцкова Л. Н.², Капашин А. В.⁴, Пасько М. А.⁴

¹ — ООО «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»), Москва, Российская Федерация

² — ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация

³ — ГБУЗ ЯО «Клиническая больница №3», Ярославль, Российская Федерация

⁴ — АО «Валента Фарм», Москва, Российская Федерация

Аннотация

Цель. Сравнительное изучение фармакокинетики и безопасности исследуемого препарата Дуоника®, таблетки кишечнорастворимые, покрытые плёночной оболочкой, 10 мг + 10 мг (АО «Валента Фарм», Россия) и референтного препарата Diclectin®, таблетки с отсроченным высвобождением, 10 мг + 10 мг (Duchesnay Inc, Канада) в рамках исследования биоэквивалентности у здоровых добровольцев после приёма пищи.

Материал и методы. Было проведено открытое рандомизированное перекрёстное двухпериодное исследование биоэквивалентности, в котором приняли участие 28 добровольцев женского пола европеоидной расы. Участники исследования были рандомизированы в две группы по 14 человек в зависимости от последовательности приёма препаратов в Периодах 1 и 2. Участники, рандомизированные в первую группу, в Периоде 1 принимали 2 таблетки препарата Diclectin®, а в Периоде 2 — 2 таблетки препарата Дуоника®. Добровольцы из второй группы принимали исследуемые препараты в обратном порядке. В каждом из Периодов исследования приём препаратов осуществлялся после завершения высококалорийного завтрака. Исследуемыми аналитами являлись доксиламин и пиридоксаль-5-фосфат (активный метаболит пиридоксина). Для количественного определения анализов были разработаны и валидированы методики с использованием высокоточной жидкостной хроматографии с использованием тандемного масс-спектрометрического детектора (ВЭЖХ-МС/МС) с тройным квадруполем. На основании полученных значений концентраций рассчитывали фармакокинетические параметры и проводили статистический анализ. Для подтверждения биоэквивалентности проводился расчёт 90 % доверительных интервалов (ДИ) для фармакокинетических параметров AUC и C_{max} исследуемых анализов. Безопасность исследуемых препаратов оценивали на основании частоты, тяжести и типа нежелательных явлений.

Результаты. Значения 90 % ДИ для отношения значений C_{max} и AUC₍₀₋₄₎ для доксиламина составили 94,08–113,71 % и 90,63–102,50 %, а для пиридоксаль-5-фосфата — 97,34–123,47 % и 90,30–111,03 %, соответственно. Полученные значения ДИ находились в пределах, установленных регуляторными требованиями и протоколом исследования (80,00–125,00 %), что позволило подтвердить биоэквивалентность исследуемых препаратов по обоим компонентам. За время проведения исследования не было зарегистрировано ни одного нежелательного явления.

Заключение. В ходе исследования была изучена фармакокинетика препаратов, содержащих фиксированную комбинацию доксиламина и пиридоксина, после приёма пищи. Полученные результаты подтвердили биоэквивалентность лекарственного препарата Дуоника® референтному препарату Diclectin®. Оба препарата показали хорошую переносимость, различий в профиле безопасности исследуемых препаратов не наблюдалось.

Ключевые слова: Дуоника; Diclectin; пиридоксин; доксиламин; тошнота и рвота беременных

Для цитирования:

Шохин И. Е., Носков С. М., Глобенко А. А., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Паруля О. М., Луцкова Л. Н., Капашин А. В., Пасько М. А. Исследование фармакокинетических параметров и безопасности лекарственного препарата Дуоника® после приёма пищи в сравнении с оригинальной комбинацией доксиламина и пиридоксина. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(2):3–11. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-3-11>. EDN: HSSTNC

Поступила: 07.06.2024. В доработанном виде: 14.06.2024. Принята к печати: 20.06.2024. Опубликована: 30.06.2024.

Study of pharmacokinetic parameters and safety of the drug Duonica® in comparison with the original combination of doxylamine and pyridoxine under fed conditions

Igor E. Shohin¹, Sergei M. Noskov^{2,3}, Alexander A. Globenko⁴, Natalia S. Bagaeva¹, Ksenia K. Karnakova¹, Olesya M. Parulya², Lyudmila N. Lutskova², Aleksey V. Kapashin⁴, Maksim A. Pasko⁴

¹ — "CPHA" LLC, Moscow, Russian Federation

² — Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation

³ — Clinical Hospital № 3, Yaroslavl, Russian Federation

⁴ — "Valenta Pharm" JSC, Moscow, Russian Federation

Abstract

Aim. A comparative study of the pharmacokinetics and safety of the investigational drug Duonica[®], enteric-soluble, film-coated tablets, 10 mg + 10 mg (Valenta Pharm JSC, Russia) and the reference drug Diclectin[®], delayed-release tablets, 10 mg + 10 mg (Duchesnay Inc, Canada) was conducted as part of the bioequivalence study in healthy volunteers under fed conditions.

Material and methods. An open-label randomized crossover two-period bioequivalence study was conducted with 28 Caucasian female volunteers. The study participants were randomly divided into two groups of 14 people depending on the order of drug administration during Periods 1 and 2. Participants randomized to the first group received 2 tablets of Diclectin[®] during Period 1 and 2 tablets of Duonica[®] during Period 2. Volunteers from the second group took the study drugs in the reverse order. During each study Period, the drugs were administered after a high-calorie breakfast. The analytes studied were doxylamine and pyridoxal-5-phosphate (an active metabolite of pyridoxine). Methods were developed and validated using high-performance liquid chromatography with a triple quadrupole tandem mass spectrometric detector (HPLC-MS/MS) to quantify the analytes. Pharmacokinetic parameters were calculated from the obtained concentration values and statistical analysis was performed. To confirm bioequivalence, 90 % confidence intervals (CI) for the pharmacokinetic parameters AUC and C_{max} of the studied analytes were calculated. The safety of the investigational drugs was assessed based on the frequency, severity and type of adverse events.

Results. The 90 % CI values for the ratio of C_{max} and AUC_{0-t} values for doxylamine were 94.08–113.71 % and 90.63–102.50 %, and for pyridoxal-5-phosphate were 97.34–123.47 % and 90.30–111.03 %, respectively. The obtained CI values were within the limits set by the regulatory requirements and the study protocol (80.00–125.00 %), which allowed us to confirm the bioequivalence of the studied drugs for both components. No adverse events were reported during the study.

Conclusion. The study investigated the pharmacokinetics of drugs containing a fixed combination of doxylamine and pyridoxine under fed conditions. The results obtained confirmed the bioequivalence of the drug Duonica[®] to the reference drug Diclectin[®]. Both drugs were well tolerated and no differences in the safety profile of the investigational drugs were observed.

Keywords: Duonica; Diclectin; pyridoxine; doxylamine; nausea and vomiting of pregnancy

For citations:

Shohin IE, Noskov SM, Globenko AA, Bagaeva NS, Karnakova KK, Parulya OM, Lutskova LN, Kapashin AV, Pasko MA. Study of pharmacokinetic parameters and safety of the drug Duonica[®] in comparison with the original combination of doxylamine and pyridoxine under fed conditions. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;2(2):3–11. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-3-11>. EDN: HSDTNC

Received: 07.06.2024. **Revision received:** 14.06.2024. **Accepted:** 20.06.2024. **Published:** 30.06.2024.

Введение / Introduction

Тошнота и рвота беременных (ТРБ) является одним из наиболее частых расстройств в первом триместре беременности. В большинстве случаев первые симптомы возникают на 8–12-й неделях беременности и ослабевают или исчезают к 16–18-й неделям, при этом у 10 % пациенток ТРБ сохраняется и после 22 недели беременности [1–5].

По данным различных авторов, в 0,3–3,6 % случаев у пациенток развивается чрезмерная рвота беременных (ЧРБ), определяемая как состояние, при котором отмечается более 3 эпизодов рвоты в день, сопровождающихся кетонурией и потерей массы тела более 3 кг или 5 % от массы тела. Неукротимая рвота достаточно часто приводит к электролитным нарушениям, в том числе к нарушению кислотно-щелочного баланса, что оказывает негативное влияние на общее самочувствие и питание женщин. При этом значительно снижается качество жизни пациенток. Статистические данные показывают, что развитие ЧРБ является самой частой причиной госпитализации в первой половине беременности [3–5].

Важно отметить, что у 10–35 % пациенток с ТРБ отмечаются симптомы депрессии, которые могут оказывать негативное влияние на повседневную и рабочую активность женщин, а также вызывать проблемы в межличностных отношениях. В ряде проведённых исследований было установлено, что появление симптомов ТРБ может являться предиктором послеродовой депрессии, расстройств сна, а также негативно влиять на когнитивные способности будущего потомства [6–9].

С начала XX века учёные пытались разработать противорвотный препарат, обладающий одновременно достаточной эффективностью и приемлемым профилем безопасности в отношении беременной женщины и плода для лечения ТРБ. Впервые антиэметический эффект приёма витамина В₆ (пиридоксина) у беременных был описан *Willis RS с соавт.* в 1942 г. В клинику за оказанием медицинской помощи обратилась женщина с выраженным симптомами ТРБ, которая до этого перепробовала различные средства, которые не оказали значимого эффекта. Пациентке было предложено внутривенное введение 20 мг пиридоксина, на что она согласилась. В тот же день после инъекции она отметила улучшение своего самочувствия и даже смогла принять пищу. На 4-й день пациентка обратилась за повторной инъекцией, сообщив, что с момента введения пиридоксина отметила значительное уменьшение симптомов ТРБ [10].

История создания противоаллергических препаратов берёт своё начало с 1910 г., когда британским учёным *Hallett DH* был открыт гистамин. Первые антигистаминные средства были синтезированы в 1937 г. французскими учёными *Staub A* и *Bouvet D*. Разработанные препараты обладали широким спектром фармакологической активности — оказывали противоаллергическое, седативное, снотворное и противорвотное действие. Среди первого поколения блокаторов H1-гистаминовых рецепторов был широко исследован доксиламин, который помимо снотворного эффекта, обладал также противорвотным действием. Предположительно механизм действия доксиламина в отношении тошноты и рвоты связан с подавлением

гистаминергической передачи импульсов в продолговатом мозге [11–12].

В 1956 г. в США компанией Merrell Dow Pharmaceuticals был зарегистрирован комбинированный лекарственный препарат Bendectin®, содержащий доксиламина сукцинат, пиридоксина гидрохлорид и дицикломина гидрохлорид. В последующем дицикломина гидрохлорид был исключён из состава действующих веществ в связи с полученными данными о его неэффективности. В Канаде комбинированный препарат, содержащий фиксированную комбинацию доксиламина и пиридоксина, был зарегистрирован под торговым названием Diclectin® в 1978 г. За время своего применения комбинация пиридоксина и доксиламина показала свою эффективность в лечении ТРБ в ряде крупных рандомизированных клинических исследований. Многолетний опыт применения подтвердил высокую безопасность и хорошую переносимость данных препаратов. Ведущие мировые организации, такие как Американская коллегия акушеров и гинекологов (ACOG) и Общество акушеров и гинекологов Канады (SOGC), рекомендуют применение комбинированных препаратов, содержащих пиридоксин и доксиламин, в качестве терапии первой линии ТРБ. В настоящее время описываемая комбинация рассматривается как одно из наиболее эффективных средств для лечения ТРБ в США, Канаде, Великобритании и Испании [13–14, 15].

Целью / The purpose проведённого исследования было сравнительное изучение фармакокинетики и безопасности исследуемого препарата Дуоника®, таблетки кишечнорастворимые, покрытые плёночной оболочкой, 10 мг + 10 мг (АО «Валента Фарм», Россия) и референтного препарата Diclectin®, таблетки с отсроченным высвобождением, 10 мг + 10 мг (Duchesnay Inc, Канада) в рамках исследования биоэквивалентности у здоровых добровольцев после приёма пищи.

Материал и методы / Materials and methods

Описываемое исследование было проведено в соответствии с протоколом клинического исследования, принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (утверждённой на 64 Ассамблеи в Форталеза, 2013 г.), трёхсторонним соглашением по Надлежащей Клинической Практике (ICH E6(R2) GCP), а также в соответствии с действующим законодательством Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и Российской Федерации (РФ). Исследование было начато после получения одобрения Совета по этике (выписка из протокола № 351 от 16 января 2024 г.), локального этического комитета (выписка из протокола № 200А от 14 февраля 2024 г.) и Министерства здравоохранения (разрешение на проведение клинических исследований № 45 от 21 февраля 2024 г.).

Проведённое исследование являлось открытым рандомизированным сравнительным перекрёстным двухпериодным исследованием биоэквивалентности (идентификатор на портале clinicaltrials.gov — NCT06342778). Перед включением в исследование все добровольцы подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. В исследование включали здоровых добровольцев женского пола в возрасте от 18 до 49 лет с индексом массы тела от 18,5 до 30 кг/м² и общей массой тела более 45 кг, соответствующих следующим критериям: уровень систолического артериального давления (САД) в пределах от 100 до 139 мм рт. ст., диастолического артериального давления (ДАД) — от 60 до 89 мм рт. ст.; частота сердечных сокращений (ЧСС) от 60 до 90 ударов в минуту; частота дыхательных движений (ЧДД) от 12 до 18 в минуту; температура тела в пределах от 36,0 до 36,9 °C; отрицательный тест на беременность, согласие использовать адекватные методы контрацепции на протяжении всего исследования и в течение 30 дней после его завершения.

Основными критериями невключения являлись: отягощённый аллергологический анамнез, гиперчувствительность или лекарственная непереносимость действующих и/или вспомогательных веществ; хронические заболевания органов и систем организма; отклонения от референтных значений лабораторных и/или инструментальных показателей; хирургические вмешательства на желудочно-кишечном тракте в анамнезе (за исключением аппендэктомии не менее, чем за 1 год до проведения скрининга); заболевания или состояния, которые по мнению врача-исследователя, могли повлиять на фармакокинетику исследуемых препаратов; острые инфекционные заболевания, перенесённые менее чем за 4 недели до проведения скрининга; приём лекарственных препаратов, оказывающих выраженное влияние на гемодинамику или функцию печени менее чем за один месяц до проведения скрининга; регулярный приём лекарственных препаратов менее чем за 3 недели до проведения скрининга или разовый приём лекарственных препаратов менее чем за 7 дней до проведения скрининга; донорская сдача крови или плазмы менее чем за 3 месяца до проведения скрининга; применение гормональных контрацептивов менее чем за 2 месяца или депо-инъекций любых лекарственных препаратов менее чем за 3 месяца до проведения скрининга; беременность или период лактации, положительный тест на беременность; участие в другом клиническом исследовании в течение 3 месяцев, предшествующих скринингу или параллельно с настоящим исследованием; приём более чем 10 ед. алкоголя в неделю (1 ед. алкоголя эквивалентна 500 мл пива, 200 мл вина или 50 мл крепких алкогольных напитков) в течение месяца до включения в исследование или анамнестические сведения об алкоголизме, наркомании, злоупотреблении лекарственными препаратами; курение; по-

ложительный анализ на ВИЧ-инфекцию, гепатит В или С, антитела к антигенам *Treponema pallidum* или положительные результаты экспресс-теста на коронавирусную инфекцию (SARS-CoV-2); клинически значимые отклонения на электрокардиограмме (ЭКГ); положительный анализ на содержание наркотических и сильнодействующих лекарственных средств; положительный тест на содержание паров алкоголя в выдыхаемом воздухе а также прочие условия, которые могли повлиять на фармакокинетику и безопасность исследуемых препаратов.

Доброволец мог быть исключён из исследования в случае его отказа от дальнейшего участия в исследовании; при возникновении ситуаций, угрожающих безопасности добровольца; при ошибочном включении добровольца в исследование; в случае возникновения в ходе исследования тяжёлого и(или) серьёзного нежелательного явления (СНЯ); при пропуске 2 и более проб крови подряд или 3 и более проб крови в течение одного Периода исследования; в случае возникновение рвоты или диареи в течение 24 ч после приёма препарата исследования, а также при появлении иных причин, препятствующих проведению исследования согласно протоколу.

Исследование состояло из периода скрининга продолжительностью не более 14 дней, Периодов 1 и 2 исследования фармакокинетики, длительность каждого из которых составила 3,5 суток (включая госпитализацию вечером накануне приёма препарата). Отмычочный период между приёмами препаратов в Периодах 1 и 2 составил 14 дней. Визит завершения проводился через 4 ± 1 день после последнего приёма препарата исследования. Общая продолжительность исследования для каждого из добровольцев составила не более 38 дней.

В исследовании приняли участие 28 добровольцев женского пола европеоидной расы, которые были рандомизированы в 2 группы по 14 человек в зависимости от последовательности приёма препаратов исследования (RT или TR, где R — референтный препарат Diclectin®, а T — исследуемый препарат Дуоника®) в Периодах 1 и 2. Добровольцы из первой группы (последовательность RT) в Периоде 1 принимали 2 таблетки препарата Diclectin®, а в Периоде 2 — 2 таблетки препарата Дуоника®. Добровольцы, рандомизированные во вторую группу (последовательность TR), принимали препараты в том же количестве, но в обратном порядке — в Периоде 1 препарат Дуоника®, а в Периоде 2 препарат Diclectin®. За 30 минут до приёма препаратов в каждом из Периодов исследования добровольцам предоставлялся завтрак, который необходимо было закончить не позднее чем за 5 минут до приёма препарата исследования. Завтрак включал в себя пищу с повышенным содержанием жиров общей калорийностью 800–1000 ккал (жиров 500–600 ккал, белков 150 ккал, углеводов 250 ккал).

В каждом Периоде у добровольца отбиралось 34 образца крови, из которых 16 образцов для опреде-

ления концентрации доксиламина и 18 образцов для определения концентрации пиридоксаль-5-фосфата. При сборе образцов для определения доксиламина использовали следующие временные точки: в течение 5 минут до приёма препаратов исследования и далее через 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после приёма препаратов исследования. Для определения концентрации пиридоксаль-5-фосфата производили отбор крови в течение 5 минут до приёма препаратов исследования и далее через 1 ч, 3 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 11 ч, 12 ч, 13 ч, 14 ч, 15 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч. В Пробе 0 определяли фоновое значение концентрации пиридоксаль-5-фосфата после приёма пищи и предзапорное содержание доксиламина.

Количественное определение исследуемых анализов проводилось методом ВЭЖХ-МС/МС с тройным квадрупольем. Разработанные методики были валидированы по следующим параметрам: селективность, пригодность стандартного образца, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, краткосрочная стабильность («настольная» и «постпрепартивная»), стабильность при пятикратной заморозке–разморозке, стабильность исходных и рабочих стандартных растворов, долгосрочная стабильность анализа в матрице. Подтверждённый аналитический диапазон методики составил 0,25–120,00 нг/мл для доксиламина и 1,00–100,00 нг/мл для пиридоксаль-5-фосфата.

Для оценки фармакокинетики исследуемого и референтного препарата рассчитывались следующие показатели: C_{\max} — максимальная плазменная концентрация; t_{\max} — время достижения C_{\max} ; $AUC_{(0-t)}$ — площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время» с момента приёма препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t ; $AUC_{(0-\infty)}$ — площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время» с момента приёма препарата до бесконечности; $AUC_{(t-\infty)}$ — остаточная (экстраполируемая) площадь под кривой, определяемая по формуле: $(AUC_{(0-\infty)} - AUC_{(0-t)})/AUC_{(0-\infty)}$; $t_{1/2}$ — период полувыведения препаратов из плазмы крови; k_{el} — константа скорости терминальной элиминации; MRT — среднее время удержания действующего вещества в плазме крови. В качестве параметров для оценки биоэквивалентности выступали показатели $AUC_{(0-t)}$ и C_{\max} исследуемых анализов.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи специализированного программного обеспечения (R Project 3.5.1 с расширением bear 2.8.3-2, StatSoft Statistica 13.3 и IBM SPSS Statistics 22). Статистический анализ для пиридоксаль-5 фосфата был проведён как с учётом, так и без учёта его фоновой концентрации.

Оценка безопасности препаратов исследования проводилась на основании частоты, типа и тяжести нежелательных явлений (НЯ), а также серьёзных не-

желательных явлений (СНЯ). На протяжении всего исследования осуществлялся мониторинг основных параметров жизнедеятельности (температура тела, уровень артериального давления, ЧСС, ЧДД), также проводилась оценка лабораторных показателей (клинический анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи) и ЭКГ.

Результаты / Results

В исследовании было randomизировано 28 добровольцев женского пола. Средний возраст добровольцев составил $33,43 \pm 7,64$ года (от 22 до 48 лет), средняя масса — $64,44 \pm 6,13$ кг (от 56,4 до 75,4 кг), рост — $168,96 \pm 3,39$ см (от 165 до 177 см), средний показатель индекса массы тела (ИМТ) — $22,55 \pm 1,81$ кг/м² (от 20,22 до 26,05 кг/м²). При оценке демографических и массово-ростовых показателей межгрупповых различий не отмечалось.

Один доброволец (1-я группа, последовательность RT) был исключён из исследования до приёма препарата в Периоде 1 в связи с отказом от дальнейшего участия в исследовании. Таким образом, оценка фармакокинетических параметров, безопасности и биоэквивалентности проводилась для 27 добровольцев.

Полученные в ходе исследования значения основных фармакокинетических параметров доксилаамина и пиридоксаль-5-фосфата представлены в табл. 1 и 2.

Как видно из представленных таблиц, изученные препараты имели сходные значения по основным

фармакокинетическим параметрам, таким как C_{max} и $AUC_{(0-t)}$. Графически фармакокинетические профили доксилаамина и пиридоксаль-5-фосфата представлены на рис. 1 и 2. На приведённых ниже рисунках видно, что характер зависимости «концентрация—время» для сравниваемых препаратов практически не различается.

Также был проведён дисперсионный анализ по изучению влияния различных факторов на показатели фармакокинетических параметров исследуемых препаратов. Для таких факторов, как «Лекарственный препарат», «Период» и «Последовательность приёма лекарственного препарата», было показано отсутствие влияния на значения фармакокинетических показателей C_{max} , $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ как доксилаамина, так и пиридоксаль-5-фосфата. При этом один из факторов, представленный как «Доброволец, вложенный в фактор «последовательность приёма лекарственного препарата», оказывал влияние на общую вариацию фармакокинетических параметров $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ доксилаамина, а также C_{max} , $AUC_{(0-t)}$ и $AUC_{(0-\infty)}$ пиридоксаль-5-фосфата.

Рассчитанные значения 90 % ДИ для отношения среднегеометрических значений C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ доксилаамина составили 94,08–113,71 % и 90,63–102,50 %, соответственно. В то же время 90 % ДИ для отношения среднегеометрических значений C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ для пиридоксаль-5-фосфата составили 97,34–123,47 % и 90,30–111,03 %, соответственно. Таким образом, рассчитанные ДИ находились в пределах, установленных регуляторными требованиями и протоколом исследо-

Таблица 1

Усреднённые значения фармакокинетических параметров доксилаамина (среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение)

Table 1

Average values of the pharmacokinetic parameters of doxylamine (arithmetic mean ± standard deviation)

Параметр	Исследуемый препарат Дуоника®	Референтный препарат Diclectin®
C_{max} , нг/мл	$85,48 \pm 17,54$	$83,21 \pm 19,86$
$AUC_{(0-t)}$, нг·ч/мл	$1552,87 \pm 389,6$	$1602,22 \pm 358,71$
$AUC_{(0-\infty)}$, нг·ч/мл	$1634,93 \pm 446,7$	$1659,52 \pm 402,74$
$\ln (C_{max})$	$4,43 \pm 0,22$	$4,39 \pm 0,26$
$\ln (AUC_{(0-t)})$	$7,32 \pm 0,26$	$7,35 \pm 0,24$
$\ln (AUC_{(0-\infty)})$	$7,36 \pm 0,28$	$7,38 \pm 0,26$
k_{el} , ч ⁻¹	$0,052 \pm 0,01$	$0,051 \pm 0,013$
t_{max} , ч	$7,41 \pm 4,04$	$6,78 \pm 4,12$
$t_{1/2}$, ч	$13,9 \pm 3,13$	$14,42 \pm 4,07$
MRT, ч	$25,07 \pm 4,97$	$25,04 \pm 5,67$
$AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$, %	$96,86 \pm 2,61$	$95,85 \pm 4,52$
$AUC_{(t-\infty)}$, %	$3,14 \pm 2,61$	$4,15 \pm 4,52$

Таблица 2

Усреднённые значения фармакокинетических параметров пиридоксаль-5-фосфата, данные после вычета его эндогенной концентрации (среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение)

Table 2

Average values of pharmacokinetic parameters of pyridoxal-5-phosphate, baseline corrected pyridoxal 5'-phosphate (arithmetic mean ± standard deviation)

Параметр	Исследуемый препарат Дуоника®	Референтный препарат Diclectin®
C_{max} , нг/мл	$18,9 \pm 8,23$	$18,95 \pm 13,52$
$AUC_{(0-t)}$, нг·ч/мл	$534,12 \pm 275,1$	$517,25 \pm 233,34$
$AUC_{(0-\infty)}$, нг·ч/мл	$723,6 \pm 455,89$	$764,45 \pm 619,18$
$\ln (C_{max})$	$2,87 \pm 0,37$	$2,78 \pm 0,55$
$\ln (AUC_{(0-t)})$	$6,16 \pm 0,52$	$6,15 \pm 0,46$
$\ln (AUC_{(0-\infty)})$	$6,42 \pm 0,59$	$6,44 \pm 0,59$
k_{el} , ч ⁻¹	$0,024 \pm 0,006$	$0,02 \pm 0,01$
t_{max} , ч	$10,22 \pm 3,61$	$10,52 \pm 3,33$
$t_{1/2}$, ч	$35,43 \pm 25,9$	$38,14 \pm 31,61$
MRT, ч	$53,67 \pm 37,49$	$58,69 \pm 46,19$
$AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$, %	$78,95 \pm 14,4$	$77,26 \pm 16,66$
$AUC_{(t-\infty)}$, %	$21,05 \pm 14,4$	$22,74 \pm 16,66$

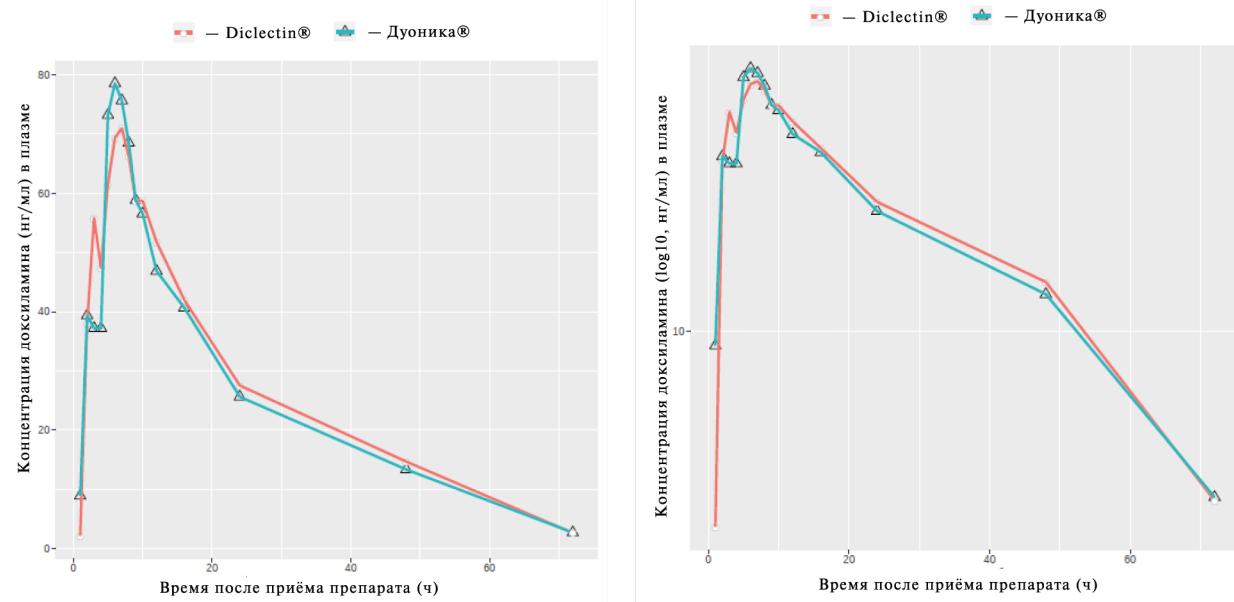


Рис. 1. Усреднённые фармакокинетические профили доксиламина в непреобразованной (линейной) шкале (слева) и полулогарифмической шкале (справа)

Fig. 1. Averaged pharmacokinetic profiles of doxylamine on an untransformed (linear) scale (left) and a semi-logarithmic scale (right)

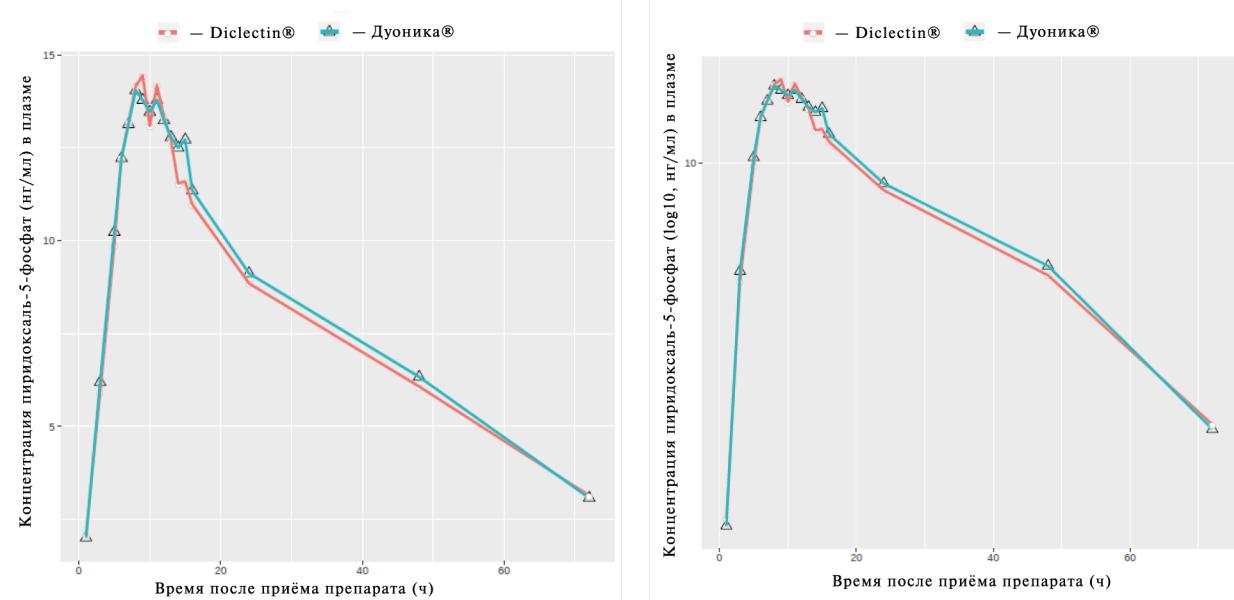


Рис. 2. Усреднённые фармакокинетические профили пиридоксаль-5-фосфата в непреобразованной (линейной) шкале (слева) и полулогарифмической шкале (справа)

Fig. 2. Averaged pharmacokinetic profiles of pyridoxal-5-phosphate on an untransformed (linear) scale (left) and a semi-logarithmic scale (right)

вания (80,00–125,00 % для каждого из исследуемых параметров), что подтверждает биоэквивалентность исследуемого препарата Дуоника® референтному препарату Diclectin® по обоим действующим веществам.

Ни у одного из 27 добровольцев, завершивших исследование в соответствии с протоколом исследования (регистр protocol), не было зарегистрировано изменений в общем состоянии, витальных функциях организма, лабораторных показателях и данных ЭКГ. В ходе исследования у добровольцев не было зарегистрировано ни одного НЯ.

Обсуждение / Discussion

Исследуемый и референтный препараты в данном исследовании были представлены пероральными лекарственными формами с пролонгированным высвобождением. Замедленный профиль высвобождения лекарственных средств позволяет уменьшить колебания плазменной концентрации действующих веществ, а также увеличить время их фармакологического действия, тем самым повышая их эффективность. Данная особенность позволила установить начальную частоту применения препарата Дуоника® по 2 таблетки 1 раз в сутки перед сном, что особо актуально для пациентов с симптомами ТРБ, для которых частый приём препарата в течение дня может быть затруднителен.

Известно, что приём пищи может оказывать существенное влияние на биодоступность лекарственных препаратов. Это может проявляться в замедлении прохождении лекарственного средства по желудочно-кишечному тракту, изменении рН желудочного или кишечного содержимого, уменьшении площади всасывания, связывании белков-транспортёров с молекулами пищи и изменении скорости кровотока в кишечнике. Помимо этого, важно учитывать качественный и количественный состав пищи. Так, приём пищи с высоким содержанием жиров способствует увеличению всасывания гидрофобных лекарственных средств за счёт улучшения их растворимости и в то же время снижает абсорбцию гидрофильных лекарственных средств, усиливает образование желчи, а также стимулирует транспорт жирорастворимых лекарств по лимфатическим сосудам [16–17].

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы статьи являются сотрудниками фармацевтической компании АО «Валента Фарм», исследовательского центра и биоаналитической лаборатории, на базе которых проводилось данное исследование.

Фактор приёма пищи приобретает особое значение, когда речь заходит о лекарственных средствах с модифицированным высвобождением. В пункте 82 Приложения № 10 Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 указано — «если 2 препарата в одинаковой лекарственной форме различаются по вспомогательным веществам или механизму, контролирующему высвобождение, их можно признать воспроизведёнными, если они биоэквивалентны *in vivo* после однократного приёма натощак и после приёма пищи, а также, при необходимости, после многократного введения». Описанное в данной статье исследование подтвердило биоэквивалентность исследуемого и референтного препаратов после приёма пищи. Ранее было проведено клиническое исследование с аналогичным дизайном, которое позволило установить биоэквивалентность исследуемых препаратов при приёме натощак (идентификатор на портале clinicaltrials.gov – NCT05498233).

Таким образом, проведённые исследования показали, что исследуемый препарат Дуоника® и референтный препарат Diclectin® обладают сходными фармакокинетическими профилями при приёме натощак и после приёма пищи.

Заключение / Conclusion

В ходе проведённого исследования была изучена фармакокинетика препарата Дуоника® после приёма пищи. Была проведена оценка его основных фармакокинетических показателей в сравнении с референтным препаратом Diclectin®. В результате проведённого анализа было установлено, что границы 90 % ДИ для отношений средних геометрических значений показателей $AUC_{(0-t)}$ и C_{max} доксирамина и пиридоксаль-5-фосфата сравниваемых препаратов находились в пределах границ, установленных регуляторными требованиями и протоколом исследования (80,00–125,00 %), что подтверждает их биоэквивалентность. Оба препарата продемонстрировали хорошую переносимость. За время проведения исследования не было зарегистрировано ни одного НЯ.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors of the article are employees of the pharmaceutical company “Valenta Pharm” JSC, research centers and bioanalytical laboratory, on the basis of which this study was conducted.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Статья опубликована при финансовой поддержке АО «Валента Фарм».

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Funding

The article was published with the financial support of "Valenta Pharm" JSC.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Шохин Игорь Евгеньевич

Генеральный директор ООО «ЦФА», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>

Igor E. Shohin

CEO of "CPHA" LLC, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>

Носков Сергей Михайлович

д. м. н., заведующий кафедрой госпитальной терапии ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация; Врач-терапевт, ГБУЗ ЯО «КБ №3», Ярославль, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3456-9409>
РИНЦ SPIN-код: 4528-7378

Sergei M. Noskov

PhD, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Hospital Therapy, FSBEI HE YaSMU MOH Russia, Yaroslavl, Russian Federation; doctor-therapist, Clinical Hospital № 3, Yaroslavl, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3456-9409>
RSCI SPIN code: 4528-7378

Глобенко Александр Александрович

Руководитель медицинского управления АО «Валента Фарм», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>
РИНЦ SPIN-код: 8135-0575

Alexander A. Globenko

Head of the Medical Department, Valenta Pharm JSC, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9295-2663>
RSCI SPIN code: 8135-0575

Багаева Наталья Сергеевна

Руководитель отдела биостатистики ООО «ЦФА», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>

Natalia S. Bagaeva

Head of the Biostatistics Department of "CPHA" LLC, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>

Карнакова Ксения Константиновна

биостатистик отдела биостатистики ООО «ЦФА», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4010-1231>

Ksenia K. Karnakova

Biostatistician of the Biostatistics Department of "CPHA" LLC, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4010-1231>

Паруля Олеся Михайловна

к. м. н., ассистент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-3655-2172>

Olesya M. Parulya

PhD, Cand. Sci. (Med.), Assistant of the Department of Hospital Therapy, FSBEI HE YaSMU MOH Russia, Yaroslavl, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-3655-2172>

Луцкова Людмила Николаевна

к. м. н., доцент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5867-6773>

Капашин Алексей Валерьевич

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

Пасько Максим Андреевич

Автор, ответственный за переписку
к. м. н., специалист группы разработки и анализа документов клинических исследований и регистрационных досье АО «Валента Фарм», Москва, Российская Федерация
e-mail: Maksim.Pasko@valentapharm.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8518-3736>
РИНЦ SPIN-код: 9153-0244

Lyudmila N. Lutskova

PhD, Cand. Sci. (Med.), Associate professor of the Department of Hospital, FSBEI HE YaSMU MOH Russia, Yaroslavl, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5867-6773>

Aleksey V. Kapashin

Head of the Group for Development and Analysis of the Clinical trial Documents and Registration Dossiers, “Valenta Pharm” JSC, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9437-0322>

Maksim A. Pasko*Corresponding author*

PhD, Cand. Sci. (Med.), Specialist of the Group for Development and Analysis of the Clinical Trial Documents and Registration Dossiers “Valenta Pharm” JSC, Moscow, Russian Federation
e-mail: Maksim.Pasko@valentapharm.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8518-3736>
RSCI SPIN code: 9153-0244

Список литературы / References

1. Ушакова Е., Романова О., Илларионова Т. Фармакотерапия при тошноте и рвоте у беременных. *Врач.* 2011;3:24-28. [Ushkalova E, Romanova O, Illarionova T. Pharmacotherapy for nausea and vomiting in pregnant women. *Vrach.* 2011;3:24-28 (In Russ.)].
2. Хабаров С.В. Тошнота и рвота беременных: влияние на качество жизни. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2023;22(2):56-62. [Khabarov SV. Nausea and vomiting of pregnancy: impact on quality of life. *Vopr. ginekol. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology).* 2023; 22(2): 56–62. (In Russ.)]. doi: 10.20953/1726-1678-2023-2-56-62.
3. Fejzo MS, Trovik J, Grootenhuis J, et al. Nausea and vomiting of pregnancy and hyperemesis gravidarum. *Nat Rev Dis Primers.* 2019 Sep 12;5(1):62. doi: 10.1038/s41572-019-0110-3.
4. Austin K, Wilson K, Saha S. Hyperemesis Gravidarum. *Nutr Clin Pract.* 2019 Apr;34(2):226-241. doi: 10.1002/ncp.10205.
5. Bustos M, Venkataraman R, Caritis S. Nausea and vomiting of pregnancy — What's new? *Auton Neurosci.* 2017 Jan;202:62-72. doi: 10.1016/j.autneu.2016.05.002.
6. Muchanga SMJ, Eitoku M, Mbela M, et al. Association between nausea and vomiting of pregnancy and postpartum depression: the Japan Environment and Children's Study. *J Psychosom Obstet Gynaecol.* 2022 Mar;43(1):2-10. doi: 10.1080/0167482X.2020.1734792.
7. Bray N, Grasby KL, Lind PA, et al. The psychosocial impact of nausea and vomiting during pregnancy as a predictor of postpartum depression. *J Health Psychol.* 2021 Jun;26(7):1061-1072. doi: 10.1177/1359105319859048. Epub 2019 Jun 27. Erratum in: *J Health Psychol.* 2021 Jun;26(7):1115. doi: 10.1177/1359105319870694.
8. Laitinen L, Nurmi M, Rautava P, et al. Sleep quality in women with nausea and vomiting of pregnancy: a cross-sectional study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2021 Feb 19;21(1):152. doi: 10.1186/s12884-021-03639-2.
9. Wang H, Rolls ET, Du X, Du J, Yang D, Li J, Li F, Cheng W, Feng J. Severe nausea and vomiting in pregnancy: psychiatric and cognitive problems and brain structure in children. *BMC Med.* 2020 Sep 1;18(1):228. doi: 10.1186/s12916-020-01701-y.
10. Willis RS, Winn WW, Morris AT, et al. Clinical observation in treatment of nausea and vomiting in pregnancy with vitamins B₁ and B₆. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 1942;44:265-271.
11. Емельянов А.В. Клиническое применение H1-антагистаминных препаратов. *Медицинский совет.* 2016;4:74-81. [Emelyanov AV. Clinical use of H1-antihistamines. *Meditinskii sovet = Medical Council.* 2016;4: 74-81 (In Russ.)].
12. Brott NR, Reddivari AKR. *StatPearls.* 2024, FL: Treasure Island.
13. Madjunkova S, Maltepe C, Koren G. The delayed-release combination of doxylamine and pyridoxine (Diclegis®/Diclectin®) for the treatment of nausea and vomiting of pregnancy. *Paediatr Drugs.* 2014 Jun;16(3):199-211. doi: 10.1007/s40272-014-0065-5.
14. Saz-Leal P, Zamorano-Domínguez L, Fries J, et al. Bioavailability of Cariban® Capsules: A Modified-Release Fixed-Dose Combination of Doxylamine and Pyridoxine to Relieve Nausea and Vomiting During Pregnancy. *Drugs R D.* 2023 Jun;23(2):185-195. doi: 10.1007/s40268-023-00425-7.
15. Campbell K, Rowe H, Azzam H, Lane CA. The Management of Nausea and Vomiting of Pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can.* 2016 Dec;38(12):1127-1137. doi: 10.1016/j.jogc.2016.08.009.
16. Koziolka M, Kostewicz E, Vertzoni M. Physiological Considerations and In Vitro Strategies for Evaluating the Influence of Food on Drug Release from Extended-Release Formulations. *AAPS PharmSciTech.* 2018 Oct;19(7):2885-2897. doi: 10.1208/s12249-018-1159-0.
17. Deng J, Zhu X, Chen Z, et al. A Review of Food-Drug Interactions on Oral Drug Absorption. *Drugs.* 2017 Nov;77(17):1833-1855. doi: 10.1007/s40265-017-0832-z.



Возможные подходы к воспроизведению эндотелиальной дисфункции. Поиск оптимальной модели

© Цорин И. Б.¹, Кожевникова Л. М.², Симоненко С. А.¹, Суханова И. Ф.²,
Вититнова М. Б.¹, Крыжановский С. А.¹

¹ — ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

² — ФГБНУ «НИИ общей и патологической физиологии», Москва, Российская Федерация

Аннотация

Цель исследования. Поиск оптимального подхода к разработке трансляционной модели эндотелиальной дисфункции (ЭД).

Материалы и методы. Эксперименты проводили на 58 белых крысах-самцах, которых рандомизировали на 8 групп: 1-я ($n = 6$) — контроль для L-метионина (эксперименты *in vitro*); 2-я ($n = 6$) — L-метионин (эксперименты *in vitro*); 3-я ($n = 6$) — контроль для L-NAME (эксперименты *in vitro*); 4-я ($n = 6$) — L-NAME (эксперименты *in vitro*); 5-я ($n = 10$) — контроль для L-метионина (эксперименты *in vivo*); 6-я ($n = 7$) — L-метионин (эксперименты *in vivo*); 7-я ($n = 10$) — контроль для L-NAME (эксперименты *in vivo*); 8-я ($n = 7$) — L-NAME (эксперименты *in vivo*). Во 2-й и 6-й группах животным интрагастрально вводили L-метионин (3 г/кг/сут в течение 7 дней), а крысам групп 4 и 8 внутрибрюшно (в/б) вводили L-NAME (0,025 г/кг/сут в течение 7 дней). Контрольные животные получали эквивалентный объём растворителя. В экспериментах *in vitro* для регистрации тонической активности колец аорты использовали четырёхканальный миограф (Danish Myo Technology). В изометрическом режиме регистрировали силу сокращений колец аорты, вызываемых норадреналином (10^{-7} М) и карбахолом (10^{-5} М). В опытах *in vivo* на наркотизированных крысах (уретан 1300 мг/кг в/б) методом лазерной допплеровской флуориметрии с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАЗМА-Д» (производство НПП «Лазма», Россия) регистрировали микроциркуляцию крови в миокарде и скелетной мышце. При оценке микротоков показатель перфузии (М) рассчитывали в перфузионных единицах (перф. ед.).

Результаты. В экспериментах *in vitro* показано, что в условиях гипергомоцистинемии, вызванной L-метионином, реакция сосудов на норадреналин остаётся практически неизменной. В то же время вазодилатирующий ответ на карбахол (10⁻⁵ М) статистически значимо уменьшался на 57% ($p = 0,005$). У животных, получавших L-NAME, не только на 55% ($p = 0,009$) снижается реакция на карбахол, но и на 48% ($p = 0,003$) увеличивается вазоконстрикторный ответ на норадреналин. В условиях ЭД, вызванной как гипергомоцистинемией, так и L-NAME, значительно снижается микроциркуляция крови в миокарде и скелетной мышце. Также показано, что в условиях модели ЭД, вызванной L-NAME, в отличие от модели ЭД, индуцированной L-метионином, не наблюдается падения массы тела крыс и практически отсутствует летальность.

Заключение. Таким образом, ЭД, индуцированная как гипергомоцистинемией, так и блокадой L-NAME эндотелиальной синтазы оксида азота, сопровождается близкими по направленности изменениями микроциркуляции крови в миокарде и скелетной мышце. Однако, учитывая результаты экспериментов *in vitro*, можно заключить, что более перспективной представляется модель ЭД, вызываемая L-NAME, в условиях которой, в отличие от ЭД, индуцированной L-метионином, не только подавляется вазодилатирующий ответ сосуда на карбахол, но и активируется вазоконстрикторная реакция на норадреналин.

Ключевые слова: крысы; эндотелиальная дисфункция; микроциркуляция; сосуды; норадреналин; карбахол

Для цитирования:

Цорин И. Б., Кожевникова Л. М., Симоненко С. А., Суханова И. Ф., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А. Возможные подходы к воспроизведению эндотелиальной дисфункции. Поиск оптимальной модели. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2024;2(12):12–19. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-12-19>. EDN: BLAZIG

Поступила: 28.05.2024. **В доработанном виде:** 08.06.2024. **Принята к печати:** 15.06.2024. **Опубликована:** 30.06.2024.

Possible approaches to reproduction of endothelial dysfunction. searching for the optimal model

© Iosif B. Tsorin¹, Lubov V. Kozhevnikova², Sophia A. Simonenko¹, Irina F. Sukhanova², Marina B. Vititnova¹, Sergey A. Kryzhanovskii¹

¹ — Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

² — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Abstract

Purpose of the study. Search for an optimal approach to developing a translational model of endothelial dysfunction (ED).

Materials and methods. The experiments were carried out on 58 white male rats, which were randomized into 8 groups: 1st ($n = 6$) — control for L-methionine (*in vitro* experiments); 2nd ($n = 6$) — L-methionine (*in vitro* experiments); 3rd ($n = 6$) — control for L-NAME (*in vitro* experiments); 4th ($n = 6$) — L-NAME (*in vitro* experiments); 5th ($n = 10$) — control for L-methionine (*in vivo* experiments); 6th ($n = 7$) — L-methionine (*in vivo* experiments); 7-a ($n = 10$) — control for L-NAME (*in vivo* experiments); 8th ($n = 7$) — L-NAME (*in vivo* experiments). In groups 2 and 6, animals were intragastrically administered L-methionine (3 g/kg/day for 7 days), and rats in groups 4 and 8 were administered i.p. with L-NAME (0.025 g/kg/day within 7 days). Control animals received an equivalent volume of solvent. In *in vitro* experiments, a four-channel myograph (Danish Myo Technology) was used to record the tonic activity of the aortic rings. The contraction strength of the aortic rings caused by norepinephrine (10^{-7} M) and carbachol (10^{-5} M) was recorded in isometric mode. In *in vivo* experiments on anesthetized rats (urethane 1300 mg/kg i.p.), blood microcirculation in the myocardium and skeletal muscle was recorded

using laser Doppler flowmetry using a computerized laser analyzer "LAZMA-D" (manufactured by NPP "Lazma", Russia). When assessing microblood flow, the perfusion index (M) was calculated in perfusion units (perf.u.).

Results. *In vitro* experiments have shown that under conditions of hyperhomocysteinemia caused by L-methionine, the vascular response to norepinephrine remains practically unchanged. At the same time, the vasodilating response to carbachol (10^{-5} M) statistically significantly decreased by 57 % ($p = 0.005$). In animals treated with L-NAME, not only did the response to carbochol decrease by 55 % ($p = 0.009$), but also the vasoconstrictor response to norepinephrine increased by 48 % ($p = 0.003$). Under conditions of ED caused by both hyperhomocysteinemia and L-NAME, blood microcirculation in the myocardium and skeletal muscle is significantly reduced. It has also been shown that in the conditions of the L-NAME-induced ED model, in contrast to the L-methionine-induced ED model, there is no drop in rat body weight and practically no mortality.

Conclusion. Thus, ED induced by both hyperhomocysteinemia and L-NAME blockade of endothelial nitric oxide synthase is accompanied by similar changes in blood microcirculation in the myocardium and skeletal muscle. However, taking into account the results of *in vitro* experiments, we can conclude that the model of ED induced by L-NAME seems more promising, under which, in contrast to ED induced by L-methionine, the vasodilatory response of the vessel to carbachol is not only suppressed, but also the vasoconstrictor reaction to norepinephrine is activated.

Keywords: rat endothelial dysfunction; microcirculation; blood vessels; norepinephrine; carbachol

For citations:

Tsorin IB, Kozhevnikova LM, Simonenko SA, Suhanova IF, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA. Possible approaches to reproduction of endothelial dysfunction. searching for the optimal model. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(2):12–19. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-12-19>. EDN: BLAZIG

Received: 28.05.2024. **Revision received:** 08.06.2024. **Accepted:** 15.06.2024. **Published:** 30.06.2024.

Введение / Introduction

В настоящее время большинство исследований, посвящённых поиску кардиотропных лекарственных средств, как правило, проводится на потенциально здоровых животных, не страдающих сердечно-сосудистой патологией. Однако такой подход не позволяет в полной мере оценить наличие/отсутствие кардио-протективного потенциала у изучаемых соединений, и тем более затрудняет экстраполяцию полученных данных на реальную клиническую ситуацию. В рамках решения этой проблемы нами ранее были разработаны трансляционные модели алкогольной кардиомиопатии и постинфарктной ХСН у крыс, что позволило не только в условиях, приближённых к клинической ситуации, оценить эффективность изучаемых нами соединений, но и выявить оригинальные биомицени для поиска инновационных кардиопротекторов [1, 2]. В развитие этого направления мы приступили к исследованиям, направленным на разработку трансляционной модели эндотелиальной дисфункции.

Эндотелий представляет собой однослойный пласт плоских клеток, выстилающих внутреннюю поверхность кровеносных и лимфатических сосудов, а также полостей сердца. Масса эндотелия сопоставима с массой печени (1,5–1,8 кг), площадь его поверхности близка к 600 m^2 (площадь футбольного поля), непрерывный монослой эндотелиальных клеток имеет длину около 7 км и состоит из 1×10^{10} клеток [3].

В физиологическом состоянии эндотелий поддерживает оптимальное состояние сосудистой стенки за счёт сбалансированного синтеза вазодилатирующих и вазоконстрикторных агентов, при этом преобладает его вазодилатирующая функция за счёт синтеза и экспрессии оксида азота (NO), ингибиторов агрегации, коагуляции и активаторов фибринолиза, антиадгезивных субстанций и т. д. [4].

Патофизиологические механизмы, лежащие в основе развития эндотелиальной дисфункции, достаточно многообразны, однако большинство авторов полагает, что дисфункция эндотелия преимущественно связана с недостаточной продукцией эндотелиальными клетками NO [5, 6]. Помимо NO, значительную роль в патогенезе эндотелиальной дисфункции играют активные формы кислорода (АФК) [7] и ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) [8].

Исследования последних лет убедительно показали важную и самостоятельную и, по всей видимости, одну из ключевых ролей дисфункции эндотелия в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Опубликовано много экспериментальных и клинических работ, посвящённых роли эндотелиальной дисфункции в возникновении и прогрессировании таких заболеваний сердечно-сосудистой системы (ССС), как артериальная гипертензия (АГ) [9, 10], ишемическая болезнь сердца (ИБС) [11], инфаркт миокарда (ИМ) [12], хроническая сердечная недостаточность (ХСН) [13], ишемическое повреждение головного мозга [14] и др. С эндотелиальной дисфункцией ассоциируются все основные факторы риска атеросклероза: АГ, гиперхолестеринемия, сахарный диабет, курение, гипергомоцистеинемия. Не менее важно и то, что не только сама эндотелиальная дисфункция (ЭД) способствует формированию и прогрессированию патологического процесса, но и основное заболевание зачастую усугубляет эндотелиальное повреждение [15].

Анализ литературы показал, что для воспроизведения ЭД у крыс используются самые разнообразные методические приёмы, в том числе модели, вызывающие метаболические нарушения, инициируемые диетой с высоким содержанием жиров, и/или сахарным диабетом, путём инъекции аллоксана или стрептозотоцина, а также трансгенные модели, воспроизводящие метаболические нарушения [16]. Однако в литературе

ре наиболее широко представлены метиониновая и L-NAME-индуцированная модели ЭД.

Показано, что диета с избыточным содержанием метионина инициирует у крыс гипергомоцистеинемию [17]. В свою очередь, гипергомоцистеинемия усиливает действие эндогенных конкурентных ингибиторов eNOS, а именно L-N-монометиларгинина (L-NMMA) и асимметричного диметиларгинина (ADMA), которые могут способствовать дисфункции эндотелия сосудов [18, 19]. Помимо этого, гипергомоцистеинемия может подавлять активность eNOS путём её дефосфорилирования по Ser-1177 [20].

Метиловый эфир N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME) — нитропроизводное аминокислоты аргинина — является неспецифическим ингибитором NOS, блокирующим активность eNOS, nNOS и iNOS [21]. Практически полное подавление L-NAME активности eNOS инициирует развитие ЭД и в последующем артериальной гипертензии [22].

Цель исследования / Purpose of the study

Поиск оптимального подхода к разработке трансляционной модели эндотелиальной дисфункции.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Опыты проводили на белых беспородных крысах самцах массой 200–220 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин (15 дней) в виварии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Животных содержали в стандартных пластиковых клетках, с предоставлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме (light off at 08-00 am). 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 ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

Животных рандомизировали на 8 групп: 1-я ($n = 6$) — контроль для L-метионина (эксперименты *in vitro*); 2-я ($n = 6$) — L-метионин эксперименты *in vitro*; 3-я ($n = 6$) — контроль для L-NAME (эксперименты *in vitro*); 4-я ($n = 6$) — L-NAME эксперименты *in vitro*; 5-я ($n = 10$) — контроль для L-метионина (эксперименты *in vivo*); 6-я ($n = 7$) — L-метионин эксперименты *in vivo*; 7-я ($n = 10$) — контроль для L-NAME (эксперименты *in vivo*); 8-я ($n = 7$) — L-NAME эксперименты *in vivo*.

Моделирование эндотелиальной дисфункции

Для моделирования ЭД использовали сопоставимые схемы применения L-метионина [23] и L-NAME [24]:

— L-метионин крысам групп №№ 2 и 6 вводили ежедневно в течение 7 суток интрагастрально в дозе 3 г/кг в виде суспензии, которая содержала метионин, солюбилизатор TWIN-80 и 1 % крахмальный раствор в соотношении 3:1:3, соответственно. В качестве контроля, группы 1 и 5, использовали животных, которым по той же схеме вводили эквивалентный объём растворителя;

— L-NAME крысам групп №№ 4 и 8 ежедневно в течение 7 суток вводили в дозе 0,025 г/кг, в/б. В качестве контроля использовали животных (группы №№ 3 и 7), которым по той же схеме вводили эквивалентный объём изотонического раствора натрия хлорида.

Эксперименты *in vitro*. Изолированные сосуды

Наркотизированных крыс (25 % раствор уретана, 4 мл/кг) декапитировали и извлекали грудной отдел аорты. Далее отрезок аорты (≈ 1 см) помещали в раствор Кребса–Хенселайта, охлажденный до +4 °C, и использовали в физиологических экспериментах. Состав раствора Кребса–Хенселайта в mM: NaCl — 121; KCl — 4,69; KH₂PO₄ — 1,1; NaHCO₃ — 23,8; MgSO₄ — 1,6; CaCl₂ — 1,6; ЭДТА — 0,032; D-глюкоза — 8.

Сосуд очищали от жировой и соединительной тканей и нарезали кольцами шириной 1,5–2,2 мм, которые крепили на держателях, помещённых в раствор Кребса–Хенселайта, аэрируемый карбогеном (5 % CO₂ в O₂) в проволочном четырёхканальном миографе (Danish Myo Technology, модель Multi Myograph System — 620M). Измерение силы сокращения аорты проводили в изометрическом режиме.

После достижения в камерах миографа температуры раствора 37,0±0,5 °C фрагменты аорты растягивали радиально до оптимального диаметра просвета, соответствующего 90 % пассивного диаметра сосуда при 100 мм рт.ст. После процедуры растяжения и последующего периода стабилизации в течение 20 мин жизнеспособность сосудов проверяли с помощью 1 мкМ фенилэфрина — агониста α-адренорецепторов. Сохранность эндотелия тестировали с помощью агониста мускариновых рецепторов 10 мкМ карбахола — негидролизуемого ацетилхолинэстеразами аналога ацетилхолина.

Эксперименты *in vivo*

Оценку микроциркуляции в тканях организма проводили методом лазерной допплеровской флюометрии (ЛДФ) с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАЗМА-Д» (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 3.0.2.395. Эксперименты проводили на наркотизированных животных (уретан 1300 мг/кг в/б). Световодный зонд фиксировали на средней трети двухглавой мышцы бедра. При регистрации ЛДФ-грамм в области верхушки сердца животных переводили на искусственную вентиляцию лёгких при помощи аппарата искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия). Длительность записи показателей микроциркуляции в каждой точке составляла 8 минут. При оценке микрокровотока показатель перфузии (М) рассчитывали в перфузионных единицах (перф. ед.).

Дополнительные процедуры

Во всех группах проводили измерение массы тела крыс (перед началом эксперимента и через сутки после окончания введения L-метионина или L-NAME, или физиологического раствора) и оценивали летальность животных.

Статистический анализ

Эксперименты *in vitro*. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5. Для сравнения средних значений между группами использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими апостериорными тестами Тьюки. Расхождения считались достоверными при $p < 0,05$.

Эксперименты *in vivo*. Нормальность распределения данных проверяли по критерию Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — по Левену. Так как результаты измерений были распределены по нормальному закону и дисперсии выборок были гомогенны, то для определения значимости различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Использованные препараты

L-метионин (>99,0 %, PanReac, Barcelona, Spain).
Метиловый эфир N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME, >98,0 %, TCI, Tokyo, Japan).
Норадреналин-(Sigma, USA).
Карбахол (Sigma, USA).
Фенилэфрин (Sigma, USA).
Уретан (>97 %, Acros organics, India).
Изотонический раствор натрия хлорида (ООО «Мосфарм», Россия).

Результаты / Results

Эксперименты *in vitro*. Анализ результатов экспериментов на изолированных кольцах аорты крыс показал, что в условиях гипергомоцистинемии, вызванной L-метионином, реакция сосудов на норадреналин (неспецифический агонист α_1 - и α_2 -адренорецепторов) в концентрации 10^{-7} М остаётся практически неизменной. Так, если в контроле изменение тонуса сосудов составляло $+17,0 \pm 0,9$ мН, то у крыс, получавших L-метионин, этот показатель равнялся $+15,4 \pm 1,6$ мН ($p = 0,4$). В то же время вазодилатирующий ответ на неспецифический агонист М- и Н-холинорецепторов карбахол (10^{-5} М) статистически значимо уменьшался на 57 % ($p = 0,005$). Так, если в контроле величина реакции составляла $-14,1 \pm 0,5$ мН, то в условиях гипергомоцистинемии она уменьшалась до $-6,0 \pm 0,9$ мН (табл. 1).

Таблица 1

Изменение реакций изолированной аорты крысы на норадреналин (10^{-7} М) и карбахол (10^{-5} М) в условиях ЭД, вызванной L-метионином (3 г/кг/сут интрагастрально в течение 7 дней)

Table 1

Changes in the reactions of isolated rat aorta to norepinephrine (10^{-7} M) and carbachol (10^{-5} M) under conditions of ED caused by L-methionine (3 g/kg/day intragastrically for 7 days)

Реакция на вещество	Группа	
	контроль, $n = 6$	эндотелиальная дисфункция, $n = 6$
Реакция на норадреналин 10^{-7} М, мН	$+17,0 \pm 0,9$	$+15,4 \pm 1,6$ $p = 0,4$
Реакция на карбахол 10^{-5} М, мН	$-14,1 \pm 0,5$	$-6,0 \pm 0,9$ $p = 0,005$

Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; p — указано по отношению к контролю.
Notes: Arithmetic averages and their standard errors are shown; p is indicated in relation to the control.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* показано, что в условиях гипергомоцистинемии вазодилатирующий ответ аорты на эталонный препарат карбахол значимо уменьшается, что, вероятно, связано с формированием ЭД.

У животных, получавших L-NAME, не только статистически значимо на 55 % ($p = 0,009$) снижается реакция на карбахол, но и значительно, на 48 % ($p = 0,003$), увеличивается вазоконстрикторный ответ на норадреналин (табл. 2). Так, если в контроле реакция на норадреналин была равна $18,2 \pm 1,7$ мН, то у животных, получавших L-NAME, она составила $27,0 \pm 1,5$ мН ($p = 0,003$).

Как следует из полученных данных, у крыс, получавших L-NAME, так же как и крыс, получавших L-метионин, не только значимо снижена реакция аорты на эталонный вазодилататор карбахол, но и, в от-

Таблица 2

Изменение реакций изолированной аорты крысы на норадреналин (10^{-7} М) и карбахол (10^{-5} М) в условиях эндотелиальной дисфункции, вызванной L-NAME (25 мг/кг/сут в/б в течение 7 дней)

Table 2

Changes in the reactions of isolated rat aorta to norepinephrine (10^{-7} M) and carbachol (10^{-5} M) under conditions of endothelial dysfunction caused by L-NAME (25 mg/kg/day i.p. for 7 days)

Реакция на вещество	Группа	
	Контроль, n = 6	Эндотелиальная дисфункция, n = 6
Реакция на норадреналин 10^{-7} М, мН	$+18,2 \pm 1,7$	$+27,0 \pm 1,5$ <i>p</i> = 0,003
Реакция на карбахол 10^{-5} М, мН	$-15,4 \pm 1,6$	$-7,0 \pm 2,0$ <i>p</i> = 0,009

Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; *p* — указано по отношению к контролю.
Notes: Arithmetic averages and their standard errors are shown; *p* is indicated in relation to the control.

личие от последних, значимо увеличена реакция сосуда на эталонный вазоконстриктор норадреналин, что достаточно убедительно свидетельствует о формировании ЭД.

Таким образом, результаты экспериментов *in vitro* свидетельствуют о том, что инициация ЭД, вызванная курсовым применением L-NAME, более предпочтительна, поскольку, в отличие от L-метионина, на фоне его применения происходит не только ослабление зависимости от эндотелия вазодилатирующей реакции, но и усиление вазоконстрикторного ответа, что патогномонично для моделируемой патологии.

Эксперименты *in vivo*. Результаты изучения влияния гипергомоцистинемии, инициированной L-метионином, на микроциркуляцию крови в сердце и скелетной мышце наркотизированных крыс представлены в табл. 3. Как

Таблица 3

Влияние ЭД, вызванной гипергомоцистинемией (L-метионин 3 г/кг/сут интрагастрально в течение 7 дней), на микроциркуляцию крови (перф. ед.) в сердце и скелетной мышце наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг в/б)

Table 3

Effect of ED caused by hyperhomocysteinemia (L-methionine 3g/kg/day intragastrically for 7 days) on blood microcirculation (perf. units) in the heart and skeletal muscle of anesthetized rats (urethane 1300 mg/kg i.p.)

Группа	Сердце	Скелетная мышца
Контроль, n = 10	$28,27 \pm 0,70$	$11,04 \pm 0,56$
ЭД, n = 7	$21,46 \pm 1,58$ <i>p</i> = 0,008	$6,13 \pm 0,30$ <i>p</i> < 0,001

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

Notes: Arithmetic averages and their standard errors are shown; *p* is indicated in relation to the control

следует из полученных данных, гипергомоцистеинемия вызывает статистически значимое уменьшение микроциркуляции крови в сердечной мышце на 24 %, *p* = 0,008) и скелетной мускулатуре (на 45 %, *p* < 0,001). Так, например, если в контроле микроциркуляция крови в сердечной мышце равнялась $28,27 \pm 0,70$ перф. ед., то на фоне приёма L-метионина — лишь $21,46 \pm 1,58$ перф. ед.

Показано, что в условиях ЭД, вызванной подавлением L-NAME активности eNOS, изменения микроциркуляции крови близки к таковым, инициированным гипергомоцистеинемией (табл. 4). Так, в сердечной мышце микроциркуляция крови снизилась с $27,90 \pm 0,72$ перф. ед. до $23,78 \pm 0,53$ перф. ед. (*p* < 0,01), а в скелетной мускулатуре с $13,81 \pm 0,34$ перф. ед. до $8,70 \pm 0,34$ перф. ед. (*p* < 0,01).

Таблица 4

Влияние ЭД, вызванной L-NAME (25 мг/кг/сут в/б в течение 7 дней), на микроциркуляцию крови (перф. ед.) в сердце и скелетной мышце наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг в/б)

Table 4

Effect of ED caused by L-NAME (25 mg/kg/day IV for 7 days) on blood microcirculation (perf. units) in the heart and skeletal muscle of anesthetized rats (urethane 1300 mg/kg i.p.)

Группа	Сердце	Скелетная мышца
Контроль, n = 10	$27,90 \pm 0,72$	$13,81 \pm 0,34$
ЭД, n = 7	$23,78 \pm 0,53$ <i>p</i> < 0,01	$8,70 \pm 0,34$ <i>p</i> < 0,01

Таким образом, ЭД, индуцированная как гипергомоцистеинемией, так и блокадой L-NAME эндотелиальной синтазы оксида азота сопровождается близкими по направленности изменениями микроциркуляции крови в миокарде и скелетной мышце, однако, анализируя полученные результаты, можно полагать, что модель ЭД, инициируемая L-NAME, на данном этапе представляется более перспективной по следующим соображениям:

— метод индуцирования ЭД с помощью L-NAME менее травматичен, поскольку внутрибрюшинное введение не требует использования зонда, применение которого может вызвать стресс у животного, а также раздражение слизистой оболочки пищевода и рвоту;

— воспроизведенная с помощью L-NAME ЭД не только инициирует подавление вазодилатирующего ответа сосуда, но, в отличие от ЭД, индуцированной L-метионином, способствует значительной активации вазоконстрикторного ответа;

— индуцирование ЭД с помощью L-NAME не сопровождается снижением массы тела животного (до начала моделирования контроль — 247 ± 3 г, группа L-NAME — 243 ± 5 г; по окончании моделирования контроль — 298 ± 7 г, группа L-NAME — 294 ± 9 г), тогда как в процессе моделирование ЭД с помощью

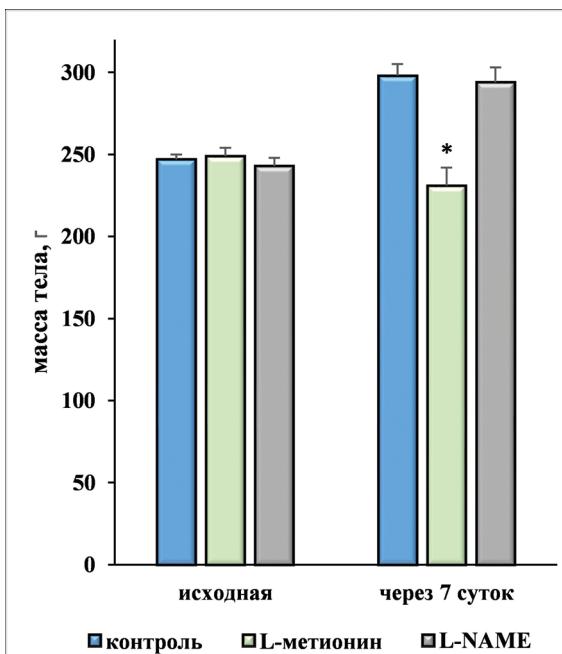


Рис. Изменения массы тела крыс под влиянием L-метионина (3 г/кг/сут интрагастрально в течение 7 дней) и L-NAME (25 мг/кг/сут в/б в течение 7 дней)

Fig. Changes in body weight of rats under the influence of L-methionine (3 g/kg/day intragastrically for 7 days) and L-NAME (25 mg/kg/day i.p. for 7 days)

Примечания: По оси ординат масса тела в г; показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; *— $p \leq 0,05$ по отношению к контролю.
Notes: The y-axis is body mass in g; arithmetic averages and their standard errors are shown; *— $p \leq 0.05$ relation to control.

L-метионина наблюдается значимое ($p \leq 0,05$) снижение массы крысы \approx на 25 % (до начала моделирования: контроль — 247 ± 3 г, группа L-метионина — 249 ± 5 г; по окончании моделирования: контроль — 298 ± 7 г, группа L-метионина — 231 ± 11 г) (рис.);

— на фоне моделирования ЭД при помощи L-NAME выживаемость крыс составила 97 %, тогда как на фоне моделирования ЭД при помощи L-метионина лишь 67 % ($p \leq 0,05$).

Заключение / Conclusion

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что опосредованная L-NAME блокада эндотелиальной синтазы NO подавляет вазодилатирующий ответ сосуда на М- и Н-холиномиметик, структурный аналог нейромедиатора ацетилхолина карбахол, активирует вазоспастическую реакцию на нейромедиатор норадреналин, что соответствует патогенетической картине, известной для ЭД. В условиях гипергомоцистинемии, инициированной L-метионином, в рамках использованной нами модели, подобной сочетанной реакции сосуда на нейромедиаторы не наблюдается, что делает L-NAME-обусловленную модель ЭД более привлекательной для дальнейших исследований по разработке трансляционной модели ЭД, воспроизводящей основные клинико-диагностические признаки этой патологии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Funding

The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Цорин Иосиф Борисович

Автор, ответственный за переписку
д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
e-mail: tsorin_ib@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
РИНЦ SPIN-код: 4015-3025

Кожевникова Любовь Михайловна

д. м. н., зав. лабораторией хронического
воспаления и микроциркуляции ФГБНУ «НИИ
общей и патологической физиологии», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1323-6472>
РИНЦ SPIN-код: 6882-6933

Симоненко София Алексеевна

лаборант-исследователь лаборатории
фармакологии кровообращения ФГБНУ
«ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация
РИНЦ SPIN-код: 3075-6496

Суханова Ирина Федоровна

к. б. н., с. н. с. лаборатории хронического
воспаления и микроциркуляции ФГБНУ «НИИ
общей и патологической физиологии», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1220-2596>

Вититнова Марина Борисовна

к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
РИНЦ SPIN-код: 1901-8919

Крыжановский Сергей Александрович

д. м. н., зав. лабораторией фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
РИНЦ SPIN-код: 6596-4865

Iosif B. Tsorin

Corresponding author

PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Mos-
cow, Russian Federation
e-mail: tsorin_ib@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
RSCI SPIN code: 4015-3025

Lubov V. Kozhevnikova

PhD, Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Chronic
Inflammation and Microcirculation FSBSI “In-
stitute of General Pathology and Pathophysiology”,
Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1323-6472>
RSCI SPIN code: 6882-6933

Sophia A. Simonenko

laboratory research assistant of laboratory of cir-
culation pharmacology Federal research center for
innovator and emerging biomedical and pharma-
ceutical technologies, Moscow, Russian Federation
RSCI SPIN code: 3075-6496

Irina F. Sukhanova

PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher of
Laboratory of Chronic Inflammation and Microcir-
culation FSBSI “Institute of General Pathology and
Pathophysiology”, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1220-2596>

Marina B. Vititnova

PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Moscow,
Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
RSCI SPIN code: 1901-8919

Sergey A. Kryzhanovskii

PhD, Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Circula-
tion Pharmacology Federal research center for innova-
tor and emerging biomedical and pharmaceutical
technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
RSCI SPIN code: 6596-4865

Список литературы / References

1. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Ионова Е.О. и др. Трансляционная модель хронической сердечной недостаточности у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018;62(2):136-148. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Ionova EO, et al. Translational model of chronic cardiac failure in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018;62(2):136-148. (In Russ.)]. doi: 10.25557/0031-2991.2018.02.136-148.
2. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б. и др. Алкогольная кардиомиопатия: трансляционная модель. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017;163(5):627-631. [Kryzhanovskii SA, Kolik 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.
3. Радайкина О.Г., Власов А.П., Мышкина Н.А. Роль эндотелиальной дисфункции в патологии сердечно-сосудистой системы. *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2018;(4):8-17. [Radaykina OG, Vlasov AP, Myshkina NA. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular system pathology. *Ul'yanovskiy mediko-biologicheskiy zhurnal*. 2018;(4):8-17. (In Russ.)]. doi: 10.23648/UMB.2018.32.22685.
4. Godo S, Shimokawa H. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(9):e108-e114. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309813.
5. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric oxide and endothelial dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020; 36(2):307-321. doi: 10.1016/j.ccc.2019.12.009.
6. Roy R, Wilcox J, Webb AJ, O'Gallagher K. Dysfunctional and dysregulated nitric oxide synthases in cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic potential. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(20):15200. doi: 10.3390/ijms242015200.
7. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018;100:1-19. doi: 10.1016/j.vph.2017.05.005.
8. Sankrityayan H, Rao PD, Shelke V, et al. Endoplasmic reticulum stress and renin-angiotensin system crosstalk in endothelial dysfunction. *Curr Mol Pharmacol*. 2023;16(2):139-146. doi: 10.2174/1874467215666220301113833.
9. Ambrosino P, Bachetti T, D'Anna SE et al. Mechanisms and clinical implications of endothelial dysfunction in arterial hypertension. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2022;9(5):136. doi: 10.3390/jcdd905013620.
10. Das D, Shruthi NR, Banerjee A, et al. Endothelial dysfunction, platelet hyperactivity, hypertension, and the metabolic syndrome: molecular insights and combating strategies. *Front Nutr*. 2023;10:221438. doi: 10.3389/fnut.2023.1221438.
11. Matsuzawa Y, Lerman A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. *Coron Artery Dis*. 2014;25(8):713-724. doi: 10.1097/MCA.0000000000000178.
12. Pavlović P, Tavčioski D, Stamenković E. Thrombocyte aggregation, endothelial dysfunction and acute myocardial infarction. *Vojnosanit Pregl*. 2009;66(4):323-327. doi: 10.2298/vsp0904323p.
13. Wang Y, Zhang J, Wang Z, et al. Endothelial-cell-mediated mechanism of coronary microvascular dysfunction leading to heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Fail Rev*. 2023;28(1):169-178. doi: 10.1007/s10741-022-10224-y.
14. Roquer J, Segura T, Serena J, Castillo J. Endothelial dysfunction, vascular disease and stroke: the ARTICO study. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27 Suppl 1:25-37. doi: 10.1159/000200439.
15. Новикова Н.А. Дисфункция эндотелия — новая мишень медикаментозного воздействия при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Врач*. 2005;8:51-53. [Novikova NA. Disfunktsiya endoteliya — novaya mishen' medikamentoznogo vozdeistviya pri serdechno-sosudistykh zabolevaniyakh. *Vrach*. 2005;8:51-53. (In Russ.)].
16. Sorop O, van de Wouw J, Chandler S, et al. Experimental animal models of coronary microvascular dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2020;116(4):756-770. doi: 10.1093/cvr/cvaa002.
17. Liu X, Qu D, He F, Lu Q, Wang J, Cai D. Effect of lycopene on the vascular endothelial function and expression of inflammatory agents in hyperhomocysteinemic rats. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007;16 Suppl 1:244-8.
18. Lenz SR, Rodionov RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atheroscler Suppl*. 2003 Dec;4(4):61-5. doi: 10.1016/s1567-5688(03)00035-7.
19. Jahangir E, Vita JA, Handy D, et al. The effect of L-arginine and creatine on vascular function and homocysteine metabolism. *Vascular Med*. 2009;4(3):239-248. doi: 10.1177/1358863X08100834.245.
20. Yan TT, Li Q, Zhang XH, et al. Homocysteine impaired endothelial function through compromised vascular endothelial growth factor/Akt/endothelial nitric oxide synthase signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010 Nov;37(11):1071-7. doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05438.x.
21. Bernátová I, Pechánová O, Kristek F. Mechanism of structural remodelling of the rat aorta during long-term NG-nitro-L-arginine methyl ester treatment. *Jpn J Pharmacol*. 1999 Sep;81(1):99-106. doi: 10.1254/jjp.81.99.
22. Saravananumar M, Raja B. Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in L-NAME induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2011 Dec 5;671(1-3):87-94. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.08.052.
23. Патент РФ на изобретение №2414755/ 20.03.2011. Бюл. №8. Емельянов С.Г., Корокин М.В., Покровский М.В. и др. Способ моделирования гиперомоцистин индуцированной эндотелиальной дисфункции. [Patent RUS №2414755/ 20.03.2011. Byul. №8. Emel'yanov SG, Korokin MV, Pokrovskii MV i dr. Sposob modelirovaniya giperomotsistein indutsirovannoi endotelial'noi disfunktsii. (In Russ.)]. Доступно по: <https://www1.fips.ru/registers-web/action?acName=clickRegister®Name=RUPAT>. Ссылка активна на 02.04.2024.
24. Патент РФ №2301670/ 27.06.2007. Бюл. №18. Покровский М.В., Kochkarov B.I., Покровская T.G. и др. Способ коррекции эндотелиальной дисфункции комбинацией эналаприла и резвератрола при l-name-индуцированном дефиците оксида азота. Опубликовано: [Patent RUS №2301670/ 27.06.2007. Byul. №18. Pokrovskii MV, Kochkarov VI, Pokrovskaya TG i dr. Sposob korrektsei endotelial'noi disfunktsii kombinatsiei enalapriila i rezveratrola pri l-name-indutsirovannom defitsite oksida azota. (In Russ.)]. Доступно по: <https://www1.fips.ru/registers-web/action?acName=clickRegister®Name=RUPAT>. Ссылка активна на 02.04.2024.



Экспериментальное изучение противовоспалительной активности диклофенака в сверхмальных дозах на модели острого каррагенинового воспаления

© Махмудова О. А.¹, Авхадиева Г. Ф.¹, Хазиахметова В. Н.¹, Никитин Д. О.², Семина И. И.²

¹ — ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Российская Федерация

² — ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Лекарственное загрязнение окружающей среды представляет собой глобальную экологическую проблему современности. Увеличение потребления лекарственных средств напрямую влияет на уровень загрязнения различных экосистем, включая водные ресурсы. Недостаточная эффективность существующих методов очистки сточных вод от лекарственных средств приводит к лекарственному загрязнению водных объектов и требует изучения влияния сверхмальных доз лекарственных средств на организм человека и животных. В пробах поверхностных вод г. Казани было обнаружено нестероидное противовоспалительное средство — диклофенак в концентрации 1×10^{-9} М.

Цель данного исследования — изучение наличия специфических фармакологических эффектов у диклофенака, обнаруженного в пробах воды в сверхмальных дозах на экспериментальных моделях патологических процессов.

Методы. В эксперименте были использованы 21 самец белой лабораторной мыши, которых поделили на три группы (в каждой по 7 мышей). В течение 4 дней мышам внутрижелудочно были введены дистиллированная вода (контрольная группа), раствор диклофенака 1×10^{-6} М (экспериментальная группа № 1), раствор диклофенака 1×10^{-9} М (экспериментальная группа № 2). На пятый день эксперимента было вызвано воспаление с помощью инъекции каррагенина-лямбда (1 %, Sigma) субплантарно в правую заднюю лапу в объёме 0,05 мл. Величину отёка определяли на племизометре ITC Life Science (США).

Результаты экспериментального изучения специфической фармакологической активности диклофенака показали, что диклофенак в сверхмальных дозах $0,32 \times 10^{-3}$ мг на 100,0 г массы способен снижать выраженность острого воспаления, вызванного субплантарным введением каррагенина и вызывать НПВС-ассоциированную гастропатию у мышей.

Вывод. Полученные данные, вероятно, свидетельствуют о потенциальном риске неблагоприятного действия лекарственного загрязнения окружающей среды диклофенаком даже в сверхмальных концентрациях.

Ключевые слова: лекарственное загрязнение окружающей среды; каррагениновое воспаление; сверхмалые дозы диклофенака; НПВС-гастропатия у мышей

Для цитирования:

Махмудова О. А., Авхадиева Г. Ф., Хазиахметова В. Н., Никитин Д. О., Семина И. И. Экспериментальное изучение противовоспалительной активности диклофенака в сверхмальных дозах на модели острого каррагенинового воспаления. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(2):20-25. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-20-25>. EDN: GNQFQA

Поступила: 28.05.2024. В доработанном виде: 11.06.2024. Принята к печати: 23.06.2024. Опубликована: 30.06.2024.

Experimental study of the anti-inflammatory activity of diclofenac in ultra-low doses on a model of acute carrageenan inflammation

© Odina A. Makhmudova¹, Guzayal F. Avkhadieva¹, Veronika N. Khaziakhmetova¹, Dmitry O. Nikitin², Irina I. Semina²

¹ — Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation

² — Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

Abstract

Relevance. Drug pollution of the environment is a global environmental problem of our time. Increased consumption of medicines directly affects the level of pollution of various ecosystems, including water resources. The insufficient efficiency of existing methods for treating wastewater from drugs leads to drug pollution of water bodies and requires studying the effect of ultra-low doses of drugs on the human body and animals. A non-steroidal anti-inflammatory drug, diclofenac, was detected in surface water samples in Kazan at a concentration of 1×10^{-9} M.

The purpose of this study is to study the presence of specific pharmacological effects of diclofenac detected in water samples in ultra-low doses in experimental models of pathological processes.

Methods. The experiment used 21 male white laboratory mice, which were divided into three groups (each with 7 mice). For 4 days, mice were intragastrically injected with distilled water (control group), diclofenac solution 1×10^{-6} M (experimental group No. 1), diclofenac solution 1×10^{-9} M (experimental group No. 2). On the fifth day of the experiment, inflammation was induced by injecting carrageenan lambda (1 %, Sigma) subplantarly into the right hind paw in a volume of 0.05 ml. The amount of edema was determined using an IITC Life Science plethysmometer (USA).

The results of an experimental study of the specific pharmacological activity of diclofenac showed that diclofenac in ultra-low doses of 0.32×10^{-3} mg per 100.0 g of weight is able to reduce the severity of acute inflammation caused by subplantar injection of carrageenan and to cause NSAID-associated gastropathy in mice.

Conclusion. The obtained data likely indicate a potential risk of adverse effects from drug contamination of the environment with diclofenac, even in ultra-low concentrations.

Keywords: drug pollution of the environment; carrageenan inflammation; ultra-low doses of diclofenac; NSAID gastropathy in mice

For citations:

Makhmudova OA, Avkhadieva GF, Khaziakhmetova VN, Nikitin DO, Semina II. Experimental study of the anti-inflammatory activity of diclofenac in ultra-low doses on a model of acute carrageenan inflammation. Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics. 2024;(2):20–25. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-20-25>. EDN: GNOFQA

Received: 28.05.2024. **Revision received:** 11.06.2024. **Accepted:** 23.06.2024. **Published:** 30.06.2024.

Введение / Introduction

Ежегодно во всём мире назначается и используется большое количество лекарственных средств. В 2023 году объём мирового фармацевтического рынка составил 1,6 триллиона долларов США, для сравнения в 2013 году мировой фармацевтический доход составлял 994 миллиарда долларов США [1]. Объём фармацевтического рынка Российской Федерации в 2023 году составил 2 573 миллиарда рублей, для сравнения в 2013 году эта цифра составляла 1 122 миллиарда рублей [2]. До 50 % приобретённых лекарственных средств остаются неиспользованными и в результате ненадлежащей утилизации попадают в окружающую среду, что может иметь опасные последствия [3]. Основным источником лекарственных средств в окружающей среде являются сточные воды. Станции очистки сточных вод не предназначены для удаления фармацевтических отходов, это приводит к выбросам лекарственных средств в неизменённом или метаболизированном виде в реки или другие крупные водоёмы [4]. Научных исследований потенциальной токсичности смесей лекарственных остатков недостаточно, но тем не менее установлено, что лекарственное загрязнение окружающей среды представляет высокий экологический риск во всем мире [5]. Наиболее часто в окружающей среде обнаруживают производные эстрогенов, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), антибактериальные средства, антидепрессанты и лекарственные средства, используемые для лечения сахарного диабета [6]. НПВС — являются вторыми, после эстрогенов, по значимости лекарственными загрязнителями. По данным исследований образцов воды в 50 странах мира, диклофенак является наиболее часто обнаруживаемым НПВС в образцах окружающей среды в концентрациях 0,032–18,74 мкг/л [7–9]. Несмотря на то, что концентрации НПВС в пресной воде можно считать относительно низкими, их высокая биологическая активность может представлять серьёзный риск и вызывать токсические эффекты у животных [10]. В эксперименте по изучению острой и хронической токсичности диклофенака и других НПВС на *Daphnia magna*, смерть ракообразных наступила спустя 24 ч после воздействия диклофенака в максимальной концентрации 486 мг/л и ибупрофена в концентрации 200 мг/л. Воздействие диклофенака

в концентрации 123,3 мг/л вызвало 50 % смертность (EC₅₀) у *D. magna* [11].

В проведённых нами ранее исследованиях проб поверхностных вод из трёх источников (оз. Нижний Кабан, р. Казанка, р. Волга) г. Казани методами ПФИА (поляризационный флуоресцентный иммуноанализ) и амперометрического иммunoсенсора было показано содержание диклофенака на уровне $(0,84–6,50) \times 10^{-9}$ М или 0,3–1,9 нг/мл [12]. Полученные результаты вызвали интерес для дальнейшего изучения наличия специфической фармакологической активности диклофенака в сверхмалых дозах. Таким образом, целью нашего исследования было экспериментальное изучение противовоспалительной активности диклофенака и наличие ульцерогенного действия в сверхмалых дозах при лечебно-профилактическом введении внутрь при моделировании острого каррагенинового воспаления.

Материалы и методы/ Materials and methods

Эксперименты проведены на 21 белых мышах-самцах, массой 38–55 г. Лабораторные животные были получены из питомника Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». До начала эксперимента все животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной диете в соответствии с Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997), а также с Правилами надлежащей лабораторной практики, утверждёнными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Казанского (Приолжского) федерального университета.

**Влияние сверхмалых доз диклофенака на острое воспаление, вызванное введением каррагенина /
The effect of ultra-low doses of diclofenac on acute inflammation caused by carrageenan administration**

Животные были разделены на три группы: контрольная группа (7 мышей) получала дистиллированную воду 1,0 мл на 100,0 г массы животного, экспериментальная группа № 1 (7 мышей) получала раствор

диклофенака в концентрации 1×10^{-6} М (моль/л) — 1,0 мл раствора на 100,0 г массы животного, экспериментальная группа № 2 (7 мышей) — раствор диклофенака в концентрации 1×10^{-9} М (моль/л) — 1,0 мл раствора на 100,0 г массы животного. Вводимые дозы для экспериментальной группы № 1 (1×10^{-6} М) составила $0,32 \times 10^{-3}$ мг на 100 г массы, для экспериментальной группы № 2 (1×10^{-9} М) — $0,32 \times 10^{-6}$ мг на 100,0 г массы мыши. Воду и растворы диклофенака вводили внутрижелудочно из расчёта 1,0 мл раствора на 100,0 г массы животного один раз в день в течение четырёх дней до введения каррагенина и спустя 12 часов после введения каррагенина. На четвёртый день эксперимента мышей лишили еды, питьевая вода была в неограниченном количестве. Во время эксперимента, помимо показателей отёка, следили также за динамикой массы. Достоверность в изменении массы тела не была выявлена.

Для моделирования острого каррагенинового воспаления использовали общепринятую модель воспаления — инъекцию каррагенина-лямбда (1 %, Sigma) субплантарно в правую заднюю лапу в объёме 0,05 мл. Введение каррагенина производили на четвёртый день после начала введения экспериментальных растворов. Величину отёка определяли на плетизометре IITC Life Science (США) по разности объёмов лапы до введения провоспалительного агента (каррагенина) и после его введения — через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 ч. Результаты по динамике отёчной реакции представлены в % прироста объёма лап мышей относительно их исходного объёма (до введения каррагенина).

Изучение желудков мышей на наличие НПВС-гастропатии после введения сверхмалых доз диклофенака / Study of mouse stomachs for the presence of NSAID gastropathy after administration of ultra-low doses of diclofenac

Спустя 12 часов после последнего введения воды и растворов диклофенака провели декапитацию мышей под лёгким эфирным наркозом с помощью гильотины (НПО «Открытая наука», Россия), извлекли желудки,

разрезали по малой кривизне, промыли 0,9 % раствором NaCl и провели макроскопическую оценку слизистой оболочки желудка. Подсчитали общее число повреждений на желудок (язвенные дефекты, число эрозий и геморрагий).

Статистический анализ был выполнен с помощью MS Excel 2019. Данные по изменению интенсивности отёков лап, число повреждений слизистой оболочки желудков оценивали по методу t-критерий Стьюдента (двуихвборочный t-тест с одинаковыми дисперсиями).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Влияние сверхмалых доз диклофенака на острое воспаление, вызванное введением каррагенина / The effect of ultra-low doses of diclofenac on acute inflammation caused by carrageenan administration

Субплантарная инъекция каррагенина к первому часу развития воспалительной реакции вызвала увеличение лапы мышей в среднем в контрольной группе на 83 % с максимальным развитием отёка через 6 часов — 206 % по сравнению с исходным объёмом — до введения каррагенина (табл.).

В экспериментальной группе № 1 максимальный отёк развился на сроке 5 часов и составлял 105 % от исходной величины. Внутрижелудочное введение раствора диклофенака (1×10^{-6} М) приводило к статистически значимому снижению величины отёка по сравнению с группой контроля на сроках 1, 2, 3, 6 часов на 50 %, 86 %, 65 %, 111 %, соответственно (табл.).

В группе № 2 максимального объёма отёк лапы достиг на сроке 5 часов и составлял 67 % от величины объёма лапы до введения каррагенина. Внутрижелудочное введение раствора диклофенака (1×10^{-6} М) способствовало статистически значимому снижению величины отёка по сравнению с группой контроля на всех сроках наблюдения: на сроках 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 часов на 80 %, 103 %, 83 %, 136 %, 113 %, 175 %, 80 %, 76 %, соответственно, и большему снижению величины отёка по сравнению с группой № 1 (1×10^{-6} М диклофенака) через 6 часов после введения каррагенина — на 64 % (рис.).

Таблица

Число повреждений (эррозии, язвы) слизистой желудков мышей на фоне 5-дневного лечебно-профилактического внутрижелудочного введения раствора диклофенака 1×10^{-6} М (группа 1), раствора диклофенака 1×10^{-9} М (группа 2) по сравнению с контролем (вода дистilledированная)

Table

The number of damages (erosions, ulcers) to the gastric mucosa of mice during a 5-day treatment and prophylactic intragastric administration of diclofenac solution 1×10^{-6} M (group 1), diclofenac solution 1×10^{-9} M (group 2) compared with control (distilled water)

Показатель	Контроль (H_2O) (n = 7)	Группа 1 (диклофенак 1×10^{-6}) (n = 7)	p Контроль и группа 1	Группа 2 (диклофенак 1×10^{-9}) (n = 7)	p Контроль и группа 2	p Группа 1 и группа 2
Число повреждений	$16,14 \pm 8,14$	$34,14 \pm 12,76$	0,007*	$49,29 \pm 9,34$	0,00001*	0,0186^

Примечания: * — $p < 0,05$ — статистически значимые различия по сравнению с группой контрольных мышей; ^ — $p < 0,05$ — статистически значимые различия в сравнении между группой 1 и группой 2.

Notes: * — $p < 0.05$ — statistically significant differences compared to the group of control mice; ^ — $p < 0.05$ — statistically significant differences in comparison between group 1 and group 2.

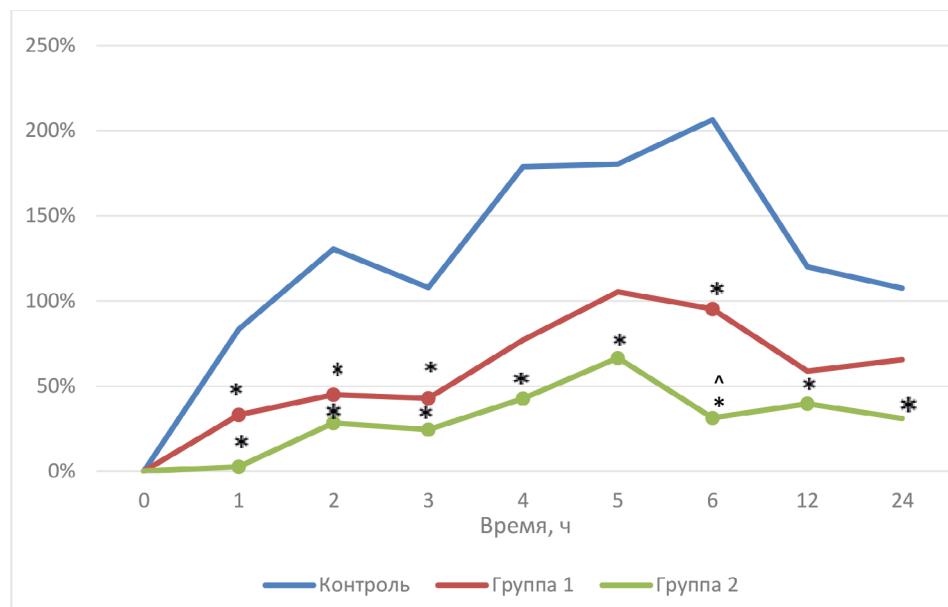


Рис. Интенсивность отёка лап мышей, вызванного субплантарным введением 1 % геля каррагенина, на фоне 5-дневного лечебно-профилактического внутрижелудочного введения раствора диклофенака 1×10^{-6} М (группа № 1), раствора диклофенака 1×10^{-9} М (группа № 2) и дистиллированной воды (контроль) (% прироста объёма лап, $n = 7$)

Fig. The intensity of swelling of the paws of mice caused by subplantar injection of 1 % carrageenan gel against the background of 5 days of therapeutic and prophylactic intragastric administration of diclofenac solution 1×10^{-6} M (group 1), diclofenac solution 1×10^{-9} M (group 2) and distilled water (control) (% increase in paw volume, $n = 7$)

Примечания: * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ^ — $p < 0,05$ по сравнению с группой 1.

Notes: * — $p < 0.05$ compared to the control; ^ — $p < 0.05$ compared to group 1.

Таким образом, диклофенак в сверхмалых дозах $0,32 \times 10^{-3}$ мг/кг и $0,32 \times 10^{-6}$ мг/кг проявляет выраженное противовоспалительное действие на модели острого каррагенинового воспаления у мышей. Установленная специфическая противовоспалительная активность диклофенака в концентрациях, которые были обнаружены в пробах поверхностных вод, свидетельствует о сохранении фармакологической активности диклофенака, попадающего в окружающую среду, что потенциально может приводить к неблагоприятным последствиям.

Изучение слизистой желудков мышей на наличие НПВС-гастропатии после введения водного раствора диклофенака в сверхмалых дозах на фоне острого каррагенинового воспаления / Examination of the gastric mucosa of mice for the presence of NSAID gastropathy after administration of an aqueous solution of diclofenac in ultra-low doses against the background of acute carrageenan inflammation

При макроскопическом осмотре слизистой желудков мышей контрольной группы (дистиллированная вода) значительных изменений выявлено не было: слизистая была бледно розового цвета, с умеренно выраженным складками, единичные геморрагии.

При осмотре слизистой желудков экспериментальной группы № 1 (1×10^{-6} М раствор диклофенака) наблюдалось значительное истончение стенок желудков, увеличение объёма желудков, множественные точечные и сливные геморрагии, заметны очаги чёрного цвета, большое количество язвенных дефектов, равномерно распределённых по всей слизистой. Общее количество повреждений достоверно превышало количество повреждений контрольной группы (табл.).

При осмотре слизистой желудков экспериментальной группе № 2 (1×10^{-9} М раствор диклофенака) наблюдалась гипертрофия желудочных складок, множественные точечные и сливные геморрагии, большое количество язвенных дефектов, равномерно распределённых по всей слизистой. Отличительной особенностью желудков мышей этой группы был небольшой размер желудков. Общее количество повреждений достоверно превышало количество повреждений контрольной группы и экспериментальной группы № 1 (см. табл.).

Таким образом, диклофенак в сверхмалых дозах $0,32 \times 10^{-6}$ мг/кг и $0,32 \times 10^{-9}$ мг/кг при внутрижелудочном введении в течении 5 дней на фоне острого каррагенинового воспаления оказывал выраженное ульцерогенное действие на слизистую оболочку желудков мышей.

Выводы/ Conclusions

При изучении наличия специфического фармакологического эффекта диклофенака в концентрациях, обнаруженных в пробах поверхностных вод г. Казани (оз. Нижний Кабан, р. Казанка, р. Волга), было установлено выраженное противовоспалительное действие диклофенака в сверхмалых дозах $0,32 \times 10^{-3}$ мг на 100 г массы (1×10^{-6} моль/л) и $0,32 \times 10^{-6}$ мг на 100 г массы

(1×10^{-9} моль/л). Введение диклофенака способствовало статистически значимому снижению выраженности острого воспаления, вызванного субплантарным введением каррагенина, а также вызывало НПВС-ассоциированную гастропатию у мышей. Полученные данные, вероятно, свидетельствуют о потенциальном риске неблагоприятного действия лекарственного загрязнения окружающей среды диклофенаком даже в сверхмалых концентрациях.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Махмудова О. А. — проведение эксперимента, подготовка текста рукописи, статистическая обработка экспериментальных данных; *Авхадиева Г. Ф.* — поиск и анализ литературных источников, подготовка лабораторных мышей к эксперименту; *Хазиахметова В. Н.* — разработка концепции и дизайна исследования, планирование эксперимента, проведение эксперимента, утверждение рукописи для публикации; *Никитин Д. О.* — проведение эксперимента, редактирование текста; *Семина И. И.* — редактирование текста, утверждение рукописи для публикации. Все авторы прочитали окончательную версию рукописи и согласились с ней.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' participation

Makhmudova OA — conducting an experiment, preparing the text of the manuscript, statistical processing of experimental data; *Avkhadieva GF* — search and analysis of literary sources, preparation of laboratory mice for the experiment; *Khaziakhmetova VN* — developing the concept and design of the study, planning the experiment, conducting the experiment, approving the manuscript for publication; *Nikitin DO* — conducting the experiment, editing the text; *Semina II* — editing the text, approving the manuscript for publication. All the authors have read the final version of the manuscript and agreed with it.

Funding

The study was performed without external funding.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Махмудова Одина Алишеровна

Автор, ответственный за переписку

Аспирант 3-го года обучения, ассистент кафедры внутренних болезней Института фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация
e-mail: odina_24@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5215-6539>

Odina A. Makhmudova

Corresponding author

Post-graduate student, Assistant, Chair of Internal Diseases, Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation
e-mail: odina_24@mail.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5215-6539>

Авхадиева Гузяль Фанисовна

Студент 6-го курса Лечебного дела Института фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0006-5518-4101>

Хазиахметова Вероника Николаевна

к. м. н., доцент кафедры внутренних болезней Института фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация; ГАУЗ «Городская поликлиника №7», Казань, Российская Федерация

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2458-283X>

Никитин Дмитрий Олегович

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

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-867X>

Семина Ирина Ивановна

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

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

Guzyal F. Avkhadieva

Student, 6 course, General medicine, Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0006-5518-4101>

Veronika N. Khaziakhmetova

PhD, Cand. Sci. (Med.), Chair of Internal Diseases, Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation; City clinic №7, Kazan, Russian Federation

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2458-283X>

Dmitry O. Nikitin

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

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-867X>

Irina I. Semina

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

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

Список литературы / References

1. Pharmacokinética.ru [Internet] Mikulic M. Global pharmaceutical industry—statistics & facts. [updated 2024 January10; cited 2024 May 9]. Available from: www.statista.com/topics/1764/global-pharmaceutical-industry/
2. Statista.com [Internet] Фармацевтический рынок в России: объём и стоимость в 2017–2022 гг. [updated 2024 February 10; cited 2024 May 9]. Available from: <https://www.statista.com/statistics/1127319/pharmaceutical-market-value-russia/>
3. Alnahas F, Yeboah P, Fliedel L, et al. Expired Medication: Societal, Regulatory and Ethical Aspects of a Wasted Opportunity. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Jan 27;17(3):787. doi: 10.3390/ijerph17030787.
4. Petrovic M, Solé M, López de Alda MJ, Barceló D. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ Toxicol Chem.* 2002 Oct;21(10):2146-56. doi: 10.1002/etc.5620211018.
5. García-Camero JP, Corpas C, Lucena MA, et al. Presence of diclofenac, estradiol, and ethinylestradiol in Manzanares River (Spain) and their toxicity to zebrafish embryo development. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021 Sep;28(36):49921-49935. doi: 10.1007/s11356-021-14167-z.
6. de Rezende AT, Mounteer AH. Ecological risk assessment of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in Brazilian surface waters. *Environ Pollut.* 2023 Dec 1;338:122628. doi: 10.1016/j.envpol.2023.122628.
7. Brun GL, Bernier M, Losier R, et al. Pharmaceutically active compounds in atlantic canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environ Toxicol Chem.* 2006 Aug;25(8):2163-76. doi: 10.1897/05-426r.1.
8. Komori K, Suzuki Y, Minamiyama M, Harada A. Occurrence of selected pharmaceuticals in river water in Japan and assessment of their environmental risk. *Environ Monit Assess.* 2013 Jun;185(6):4529-36. doi: 10.1007/s10661-012-2886-4.
9. Zhao JL, Ying GG, Liu YS, et al. Occurrence and a screening-level risk assessment of human pharmaceuticals in the Pearl River system, South China. *Environ Toxicol Chem.* 2010 Jun;29(6):1377-84. doi: 10.1002/etc.161.
10. Acuña V, Ginebreda A, Mor JR, et al. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environ Int.* 2015 Dec;85:327-33. doi: 10.1016/j.envint.2015.09.023.
11. Du J, Mei CF, Ying GG, Xu MY. Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2016 Jul;97(1):84-90. doi: 10.1007/s00128-016-1806-7.
12. Medyantseva EP, Gazizullina ER, Brusnitsyn DV, et al. Immunochemical Determination of Diclofenac in Tablets, Artificial Urine, and Surface Water Using Ruthenium and Rhenium Complexes. *Pharm Chem J.* 2023;57(4):573-577. doi: 10.1007/s11094-023-02922-0.



Синдром «Праздничное сердце» у крыс: особенности микроциркуляции, функционального состояния и анатомии сердца

© Крыжановский С. А., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Вититнова М. Б., Симоненко С. А., Колик Л. Г.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация

Цель исследования. Изучение на разработанной нами модели синдрома «Праздничное сердце» у крыс особенностей микроциркуляции, функционального состояния и анатомии сердца.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на белых беспородных крысах самцах. Синдром «Праздничное сердце» моделировали следующим образом: животные в течение первых 10 дней получали в качестве единственного источника жидкости 10 % водный раствор этанола, затем 10 дней — водопроводную воду и последующие 10 дней снова 10 % водный раствор этанола. Через сутки после окончания повторного приёма алкоголя животных брали в эксперимент. Контролем служили животные, получавшие свободный доступ к водопроводной воде. У части крыс опытной группы ($n = 10$) регистрировали эхокардиограмму до начала эксперимента и на 31-е сутки эксперимента, после чего у них методом лазерной допплеровской флюметрии измеряли уровень микроциркуляции крови и лимфы в мозге и сердце. У оставшихся животных ($n = 10$) микроциркуляцию крови и лимфы в мозге и сердце оценивали на 3-и сутки алкогольной депривации.

Результаты. Анализ полученных данных показал, что в условиях модели синдрома «Праздничное сердце» происходят существенные изменения в анатомии, функциональной активности и геометрии сердца: отмечается значимое истончение передней стенки левого желудочка сердца (ЛЖ), увеличение систолических и диастолических объёмов и размеров ЛЖ и существенное ($p = 0,0018$) снижение его инотропной функции. Эти изменения происходят на фоне значительного ($p = 0,0081$) снижения уровня микроциркуляции крови в миокарде, однако на 3-и сутки алкогольной депривации кровоток в микрососудах сердца статистически значимо ($p = 0,0285$) возрастает.

Заключение. В модельных экспериментах, воспроизводящих синдром «Праздничное сердце», впервые показано, что этанол вызывает существенные изменения в микроциркуляции, анатомии, функциональной активности и геометрии ЛЖ сердца, что, по всей видимости, может играть одну из ключевых ролей в формировании патогномоничной для этого синдрома электрической нестабильности миокарда.

Ключевые слова: синдром «Праздничное сердце»; крысы; сердце; эхокардиография; микроциркуляция крови и лимфы; инотропная функция ЛЖ; ремоделирование ЛЖ

Для цитирования:

Крыжановский С. А., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Вититнова М. Б., Симоненко С. А., Колик Л. Г. Синдром «Праздничное сердце» у крыс: особенности микроциркуляции, функционального состояния и анатомии сердца. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(2):26–33. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-26-33>. EDN: EYQMSH

Поступила: 28.05.2024. В доработанном виде: 09.06.2024. Принята к печати: 15.06.2024. Опубликована: 30.06.2024.

“Holiday heart” syndrome in rats: Features of microcirculation, functional state and anatomy of the heart

© Sergey A. Kryzhanovskii, Iosif B. Tsorin, Ekaterina O. Ionova, Marina B. Vититнова, Sophia A. Simonenko, Larisa G. Kolik

Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract

Purpose of the study. Studying the features of microcirculation, functional state and anatomy of the heart using the “Holiday Heart” syndrome model in rats we developed.

Materials and methods. Experiments were carried out on white outbred male rats. The “Holiday Heart” syndrome was modeled as follows: animals received a 10 % aqueous ethanol solution as the only source of fluid for the first 10 days, then tap water for 10 days, and again a 10 % aqueous ethanol solution for the next 10 days. One day after the end of the repeated intake of alcohol, the animals were taken into the experiment. Animals that received free access to tap water served as control.

Some rats in the experimental group ($n = 10$) had an echocardiogram recorded before the start of the experiment, and on the 31st day of the experiment, after which the level of microcirculation of blood and lymph in the brain and heart was measured using laser Doppler flowmetry. In the remaining animals ($n = 10$), microcirculation of blood and lymph in the brain and heart was assessed on the 3rd day of alcohol deprivation.

Results. Analysis of the obtained data showed that in the conditions of the “Holiday Heart” syndrome model, significant changes occur in the anatomy, functional activity and geometry of the heart: there is a significant thinning of the anterior wall of the left ventricle heart (LV), an increase in systolic and diastolic volumes and sizes of the LV and a significant ($p = 0.0018$) decrease in its inotropic function. These changes occur against the background of a significant ($p = 0.0081$) decrease in the level of blood microcirculation in the myocardium, however, on the 3rd day of deprivation, blood flow in the microvessels of the heart increases statistically significantly ($p = 0.0285$).

Conclusion. In model experiments reproducing the “Holiday Heart” syndrome, it was shown for the first time that ethanol causes significant changes in the microcirculation, anatomy, functional activity and geometry of the left ventricle of the heart, which, apparently, can play a key role in the formation of myocardial electrical instability pathognomonic for this syndrome.

Keywords: “Holiday heart” syndrome; rats; heart; echocardiography; blood and lymph microcirculation; LV inotropic function; LV remodeling

For citations:

Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Ionova EO, Vititnova MB, Simonenko SA, Kolik LG. "Holiday heart" syndrome in rats: Features of microcirculation, functional state and anatomy of the heart. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(2):26–33. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-26-33>. EDN: EYQMSH

Received: 28.05.2024. **Revision received:** 09.06.2024. **Accepted:** 15.06.2024. **Published:** 30.06.2024.

Введение / Introduction

Синдром «Праздничного сердца» (Holiday heart syndrome) — алкоголь-обусловленная патология миокарда, возникающая в периоде похмелья после эпизодического употребления за короткий промежуток времени (3–7 дней) большого количества алкоголя и клинически проявляющаяся пароксизмами нарушений сердечного ритма, преимущественно фибрилляцией предсердий. В отличие от алкогольной кардиомиопатии, формирующейся на фоне хронического злоупотребления алкоголем и также сопровождающейся нарушениями сердечного ритма, аритмии при синдроме «Праздничное сердце» развиваются и у практически здоровых людей вследствие электрофизиологических изменений в кардиомиоцитах, вызванных алкогольной интоксикацией в период похмелья [1].

Если клинические проявления синдрома «Праздничное сердце» хорошо изучены, то механизмы, лежащие в его основе, до конца не ясны, в том числе остаётся не изученным влияние злоупотребления алкоголем на микроциркуляцию, анатомию, функциональную активность и геометрию сердца. Вместе с тем, такая информация представляется достаточно важной для понимания механизмов, лежащих в основе патогномоничных для синдрома «Праздничное сердце» нарушений сердечного ритма. Такое утверждение основывается на том, что в эксперименте и клинике показано, что:

- нарушение микроциркуляции в сердечной мышце, т. е. микрососудистая коронарная дисфункция, провоцирует развитие нарушений сердечного ритма [2–4];
- дилатация полости левого желудочка сердца является провоцирующим фактором аритмогенеза [5, 6];
- снижение инотропной функции левого желудочка сердца — независимый предиктор злокачественных аритмий [7, 8].

Исходя из вышесказанного, представляется интересным на разработанной нами модели синдрома «Праздничное сердце», которая воспроизводит характерную для этой патологии электрическую нестабильность кардиомиоцитов, изучить особенности микроциркуляции, функционального состояния и анатомии сердца, что позволит выявить возможные коррелянты между состоянием кардиогемодинамики и аритмогенной активностью миокарда.

Цель настоящего исследования / Purpose of the study — изучение на модели синдрома «Праздничное сердце» у крыс особенностей микроциркуляции, функционального состояния и анатомии сердца.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. 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». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин (15 дней) в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали индивидуально, в стандартных пластиковых клетках (440 × 276 × 160 мм), с предоставлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме (light off at 08-00 am). 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), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (протокол №1 от 27 сентября 2016 г). Эксперименты разрешены биоэтической комиссией (протокол № 1 от 18 января 2023 г).

Экспериментальная процедура. Исследование проводили на разработанной нами ранее модели синдрома «Праздничное сердце» [9]. В эксперимент было включено 30 крыс, которых рандомизировали на 2 группы: контрольную ($n = 10$) — животные, имевшие свободный доступ к водопроводной воде, и экспериментальную ($n = 20$) — крысы, получавшие в качестве единственного источника жидкости 10 % водный раствор этанола в течение 10 дней, затем 10 дней — водопроводную воду и последующие 10 дней снова 10 % водный раствор этанола. Перед началом эксперимента из экспериментальной группы случайным образом отбирали 10 крыс для проведения эхокардиографического исследования (подгруппа 2a). Через сутки после окончания повторной алкоголизации в подгруппе 2a проводили повторное эхокардиографическое исследование, после чего животных передавали для оценки уровня микроциркуляции

в мозге и сердце. У оставшихся животных (подгруппа 2б, $n = 10$) оценивали микроциркуляцию на 3-й день алкогольной депривации.

В подгруппе 2а от фибрилляции после вскрытия перикарда погибло 3 животных, а подгруппе 2б от наркоза погибло 1 животное.

Эхокардиографические исследования. Крыс анестезировали (кетамин, 100 мг/кг, внутрибрюшинно (в/б)) и фиксировали на операционном подогреваемом столике Surgi Suite (Kent Scientific Corporation, США) 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 параптернальной позиции по длинной оси сердца. В М-модальном режиме оценивали конечно-систолический (КСР) и конечно-диастолический (КДР) размеры левого желудочка (ЛЖ). Затем при помощи компьютерной программы определяли следующие показатели: систолическая толщина передней стенки (СТПС), систолическая толщина задней стенки (СТЗС), диастолическая толщина передней стенки (ДТПС), диастолическая толщина задней стенки (ДТЗС), конечно-систолический (КСО) и конечно-диастолический (КДО) объём ЛЖ, фракция укорочения (ФУ) ЛЖ, фракция выброса (ФВ) ЛЖ, ударный объём (УО) и минутный объём (МО). Затем по формуле $1,04 \times ((0,1 \times \text{КДР} + 0,1 \times \text{ДТЗС} + 0,1 \times \text{ДТПС})^3 - (0,1 \times \text{КДР})^3) \times 0,8 + 0,6$ рассчитывали массу ЛЖ и относительную массу ЛЖ. Вычисляли ударный и сердечный индексы (отношение ударного объёма к массе тела в кг: УИ = УО/Мтела; отношение минутного объёма к массе тела в кг: СИ = МО/Мтела). Оценку эхокардиографических показателей проводили как минимум по пяти последовательным сердечным циклам. Все измерения выполняли в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии [10]. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф Mindray DC-60 (Китай) с электронным фазированным датчиком P10-4E (5,0/11,0 МГц).

Измерение микроциркуляции. Крыс анестезировали (уретан, 1300 мг/кг, в/б) и фиксировали на операционном подогреваемом столике Surgi Suite (Kent Scientific Corporation, США). Оценку уровня микроциркуляции в сердце и мозге проводили методом лазерной допплеровской флюметрии (ЛДФ) с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАЗМА-Д» (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 3.0.2.395. В ходе эксперимента осуществлялась одновременная регистрация показателей микроциркуляции крови и микроциркуляции лимфы. Параметры микротоков в коре головного мозга регистрировали, поместив датчик прибора в высушенное в теменной области черепа отверстие ($S \approx 1 \text{ мм}^2$), твёрдую мозговую оболочку в пределах которого удаляли. При регистрации

ЛДФ-грамм в области верхушки сердца животных переводили на искусственную вентиляцию лёгких при помощи аппарата искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия). Длительность записи показателей микроциркуляции в каждой точке составляла 8 минут. Величину микротоков и микролимфотока — показатель перфузии (М) — выражали в перфузионных единицах (перф. ед.) [11, 12].

Статистический анализ. Нормальность распределения данных проверяли по критерию Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий по Левену. Так как результаты измерений внутрисердечной гемодинамики и микроциркуляции крови и лимфы были распределены по нормальному закону, а дисперсии были гомогенны, то для определения значимости различий между результатами двух измерений гемодинамики использовали t-критерий Стьюдента для зависимых выборок. Для сравнения показателей микроциркуляции крови использовали однофакторный дисперсионный анализ, с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену–Кейлсу. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки I рода $p \leq 0,05$.

Препараторы. Спирт этиловый 96 %, разбавленный водопроводной водой до 10 % (ООО «Главспирт», Россия), кетамин (субстанция, ЗАО «Акрихин», Россия), уретан (субстанция, Sigma-Aldrich).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Эхокардиография. Согласно результатам эхокардиографических исследований, у животных с синдромом «Праздничное сердце» наблюдаются существенные изменения в анатомии, функциональной активности и инотропной функции ЛЖ сердца (табл. 1). Так, у крыс за период наблюдения значительно увеличивались размеры и объёмы полости ЛЖ, например, КСО увеличился на $23,28 \pm 4,86 \text{ мм}^3$ ($p = 0,0014$), а КДР на $0,56 \pm 0,16 \text{ мм}$ ($p = 0,0084$). Увеличение размеров полости ЛЖ сопровождалось статистически значимым источником передней стенки ЛЖ. Так, если перед началом эксперимента ДТПС составляла в среднем $1,30 \pm 0,02 \text{ мм}$, то у животных с синдромом «Праздничное сердце» этот показатель уменьшался до $1,17 \pm 0,04 \text{ мм}$ ($p = 0,007$).

Изменения анатомии и геометрии ЛЖ сопровождались уменьшением ударного индекса сердца на $176,57 \pm 68,61 \text{ мл}/\text{см}^2$ и снижением его инотропной функции. Так, например, ФВ статистически значимо уменьшалась с $87,1 \pm 0,9 \%$ до $81,8 \pm 0,7 \%$ ($p = 0,0018$).

Помимо этого, показано, что масса тела крыс с синдромом «Праздничное сердце» за период наблюдения увеличилась на $0,130 \pm 0,006 \text{ кг}$ ($p < 0,0001$), однако абсолютная масса ЛЖ практически не изменялась, при этом его относительная масса уменьшалась с $0,412 \pm 0,009 \%$ до $0,253 \pm 0,006 \%$ ($p = 0,0001$).

Таблица 1

Эхокардиографические характеристики сердца крыс ($n = 10$) с синдромом «Праздничное сердце»

Table 1

Echocardiographic characteristics of the heart of rats ($n = 10$) with the “Holiday Heart” syndrome

Показатель	Исходный уровень	30-е сутки	Изменение	<i>P</i> по отношению к исходному уровню
ЧСС, уд./мин	437±14	453±12	+16±20	0,451
КСР, мм	2,07±0,10	2,62±0,08	+0,56±0,12	0,0015
СТЗС, мм	2,30±0,04	2,22±0,03	-0,08±0,04	0,111
СТПС, мм	2,29±0,04	2,17±0,06	-0,12±0,05	0,050
КСО, мм ³	24,99±3,40	48,27±3,97	+23,28±4,86	0,0014
КДР, мм	4,20±0,16	4,76±0,10	+0,56±0,16	0,0084
ДТЗС, мм	1,33±0,03	1,27±0,04	-0,07±0,03	0,081
ДТПС, мм	1,30±0,02	1,17±0,04	-0,13±0,04	0,0070
КДО, мм ³	189,28±18,61	264,22±15,89	+74,95±20,14	0,0059
УО, мм ³	164,29±15,72	215,95±12,49	+51,66±16,06	0,0123
Масса тела, кг	0,196±0,003	0,326±0,007	+0,130±0,006	<0,0001
УИ, мм ³ /кг	841,28±81,21	664,71±40,37	-176,57±68,61	0,0329
МО, мл/мин	71,3±6,9	97,8±6,2	+26,5±7,9	0,0010
СИ, мл/мин/кг	365,2±35,9	301,2±19,9	-64,0±32,7	0,086
ФУ, %	50,9±1,1	44,9±0,8	-6,0±1,3	0,0021
ФВ, %	87,1±0,9	81,8±0,7	-5,2±1,1	0,0018
Масса ЛЖ, г	0,806±0,013	0,821±0,012	+0,015±0,015	0,36
Относительная масса ЛЖ, %	0,412±0,009	0,253±0,006	-0,160±0,008	0,0001

Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; ЛЖ — левый желудочек сердца; КСР — конечно-систолический размер ЛЖ; СТЗС — систолическая толщина задней стенки ЛЖ; СТПС — систолическая толщина передней стенки ЛЖ; КСО — конечно-систолический объём ЛЖ; КДР — конечно-диастолический размер ЛЖ; ДТЗС — диастолическая толщина задней стенки ЛЖ; ДТПС — диастолическая толщина передней стенки ЛЖ; КДО — конечно-диастолический объём ЛЖ; УО — ударный объём ЛЖ; УИ — ударный индекс ЛЖ; МО — минутный объём сердца; СИ — сердечный индекс; ФУ — фракция укорочения; ФВ — фракция выброса.

Notes: Arithmetic means and standard mean errors are shown; ЛЖ — LV — left ventricle of the heart; КСР — ESD — LV end-systolic dimension; СТЗС — STPW — systolic thickness of the LV posterior wall; СТПС — STAW — systolic thickness of the LV anterior wall; КСО — ESV — LV end-systolic volume; КДР — EDD — LV end-diastolic dimension; ДТЗС — DTPW — diastolic thickness of the LV posterior wall; ДТПС — DTAW — diastolic thickness of the LV anterior wall; КДО — EDV — LV end-diastolic volume; УО — SV — LV stroke volume; УИ — SI — LV stroke index; МО — CO — cardiac output; СИ — CI — cardiac index; ФУ — FS — shortening fraction; ФВ — EF — ejection fraction.

Таким образом, полученные в результате эхокардиографических исследований данные свидетельствуют о том, что у крыс с синдромом «Праздничное сердце» сердце претерпевает значительную негативную трансформацию, включающую в себя изменения анатомии, функциональной активности и геометрии ЛЖ. Так, увеличение размеров и объёмов ЛЖ сердца позволяет говорить о формировании патологического, но, по всей видимости, обратимого ремоделирования ЛЖ. Далее снижение сократимости ЛЖ на фоне увеличения КДО может привести к росту конечно-диастолического давления и в итоге к увеличению среднего давления в левом предсердии, что прогностически не благоприятно, поскольку известно, что гипертензия в левом предсердии рассматривается как один из предикторов фибрилляции предсердий [13, 14]. Особый интерес заслуживает динамика изменения ФВ левого желудочка сердца: ФВ, хотя и снижается, но это снижение (с 87,1±0,9 % до 81,8±0,7 %) происходит в пределах физиологической нормы для крыс [15].

Известно, что более объективным по сравнению с ФВ эхокардиографическим показателем наличия сердечной недостаточности является увеличение соотношения КСР/КДР и КСО/КДО параллельно со снижением соотношения УО/КДО [16]. В наших экспериментах, если ФВ снижается до величин, близких к нижней границе нормы, то соотношение КСР/КДР увеличивается с 0,49 до 0,55, КСО/КДО — с 0,13 до 0,18; а соотношение УО/КДО уменьшается с 0,86 до 0,81, что может свидетельствовать о начале формирования скрытой фазы сердечной недостаточности, которая также может вносить свой вклад в формирование электрической нестабильности кардиомиоцитов.

Микроциркуляция. Анализ результатов, полученных при изучении особенностей микроциркуляции крови в теменной области мозга крыс с синдромом «Праздничное сердце» свидетельствует о том, что у них в 1-е сутки алкогольной депривации, по сравнению с контрольными животными, микрокровоток статистически значимо снижается, однако на 3-и сутки депривации

он возвращается к исходному уровню (табл. 2). Так, если у контрольных животных величина микроциркуляции крови составляла $30,68 \pm 0,50$ перф. ед., то у крыс, получавших этанол, в 1-е сутки алкогольной депривации микрокровоток равнялся $22,06 \pm 1,06$ перф. ед ($p = 0,0001$), а на 3-и сутки депривации — $30,76 \pm 0,69$ перф. ед.

В миокарде в 1-е сутки алкогольной депривации микрокровоток, так же как и в теменной области мозга, значительно снижался (табл. 2): если у контрольных животных он равнялся $26,75 \pm 2,01$ перф. ед., то у крыс с синдромом «Праздничное сердце» он составлял $18,34 \pm 1,84$ перф. ед. ($p = 0,0081$). Однако, если на 3-и сутки депривации микрокровоток в ткани мозга возвращался к исходному уровню (табл. 2), то в миокарде он резко возрастал и значительно ($p = 0,0285$) превышал таковой у контрольных животных — $33,56 \pm 1,06$ перф. ед. и $26,75 \pm 2,01$ перф. ед., соответственно.

Микроциркуляция лимфы в теменной области мозга у крыс с синдромом «Праздничное сердце» статистически значительно снижается как в 1-е, так и 3-и сутки

алкогольной депривации (табл. 3). Если у контрольных животных микроток лимфы был равен $0,75 \pm 0,02$ перф. ед., то в 1-е и 3-и сутки депривации он равнялся $0,50 \pm 0,08$ ($p = 0,024$) и $0,55 \pm 0,06$ ($p = 0,036$), соответственно. В миокарде микроциркуляция лимфы в условиях синдрома «Праздничное сердце», в отличие от таковой в теменной области мозга, не изменялась (табл. 3).

Хорошо известно, что нарушение микроциркуляции приводит не только к возникновению энергетического дефицита, но и способствует накоплению токсических продуктов метаболизма кардиомиоцитов [17]. В условиях синдрома «Праздничное сердце» снижение в 1-е сутки алкогольной депривации уровня микроциркуляции крови в миокарде более чем на 30 % не только способствует накоплению в тканях сердца продуктов его метаболизма, но и аккумуляции в них как этанола, обладающего собственной токсичностью, так и не менее токсичных его метаболитов. Есть все основания полагать, что снижение доставки к кардиомиоцитам O_2 и энергетических субстратов на фоне

Таблица 2

Изменения микроциркуляция крови в мозге и сердце крыс с синдромом «Праздничное сердце»

Table 2

Changes in blood microcirculation in the brain and heart of rats with “Holiday heart” syndrome

Орган	Группа	<i>n</i>	Показатель микроциркуляции, перф. ед.	Вероятность ошибки I рода, <i>p</i>
Мозг	Контроль	10	$30,68 \pm 0,50$	—
	Алкогольная депривация 1 сут	10	$22,06 \pm 1,06$	$0,0001$
	Алкогольная депривация 3 сут	9	$30,76 \pm 0,69$	0,94
Сердце	Контроль	10	$26,75 \pm 2,01$	—
	Алкогольная депривация 1 сут	7	$18,34 \pm 1,84$	$0,0081$
	Алкогольная депривация 3 сут	9	$33,56 \pm 1,06$	0,0285

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

Notes: Arithmetic averages and their standard errors are shown; *p* is indicated in relation to the control.

Таблица 3

Изменения микроциркуляция лимфы в мозге и сердце крыс с синдромом «Праздничное сердце»

Table 3

Changes in lymph microcirculation in the brain and heart of rats with the “Holiday Heart” syndrome

Орган	Группа	<i>n</i>	Показатель микроциркуляции, п. ед.	Вероятность ошибки I рода, <i>p</i>
Мозг	Контроль	7	$0,75 \pm 0,02$	—
	1-е сутки алкогольной депривации	10	$0,50 \pm 0,08$	$p = 0,024$
	3-и сутки алкогольной депривации	9	$0,55 \pm 0,06$	$p = 0,036$
Сердце	Контроль, <i>n</i> = 10	10	$0,78 \pm 0,09$	—
	1-е сутки алкогольной депривации	7	$0,79 \pm 0,07$	$p = 0,93$
	3-и сутки алкогольной депривации	9	$0,75 \pm 0,09$	$p = 0,79$

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

Notes: Arithmetic averages and their standard errors are shown; *p* is indicated in relation to the control.

избыточного накопления в миокарде разнообразных токсических продуктов лежит в основе продемонстрированных нами при помощи эхокардиографии изменений в анатомии и функциональной активности сердца. Не менее важно и то, что снижение уровня микроциркуляции на фоне этанол-обусловленного повреждения миокарда может играть одну из ключевых ролей в инициации электрической нестабильности кардиомиоцитов.

На 3-и сутки алкогольной депривации в миокарде отмечается значительное ($p = 0,0081$) увеличение (\approx на 50 %) по сравнению с 1-ми сутками микрокровотока, который превосходит на 25 % ($p = 0,0285$) таковой у контрольных животных. Значительное увеличение микрокровотока, с одной стороны, способствует интенсификации энергетического метаболизма кардиомиоцитов, а с другой – содействует «отмыванию» миокарда от накопившихся в нем токсических продуктов. Помимо этого, столь резкое увеличение миокардиального микрокровотока подтверждает нашу гипотезу о том, что выявленные в 1-е сутки алкогольной депривации нарушения системной кардиогемодинамики носят обратимый характер. Такое утверждение подтверждают и

клинические наблюдения, свидетельствующие о том, что у пациентов с синдромом «Праздничное сердце» нарушения ритмической активности сердца наблюдаются преимущественно в 1-е сутки после резкого прекращения приёма алкоголя [1, 17, 18].

Говоря об особенностях микроциркуляции крови и лимфы в коре теменной области мозга, следует отметить, что в 1-е сутки алкогольной депривации снижение микрокровотока \approx на 30 % на фоне сопоставимого падения микротока лимфы, по всей видимости, в той или иной мере связано с формированием центральных проявлений сопутствующего синдрому «Праздничное сердце» похмельного синдрома, однако этот вопрос требует отдельного изучения.

Таким образом, в модельных экспериментах, воспроизводящих синдром «Праздничное сердце» у крыс, показано, что злоупотребление алкоголем приводит к нарушению функционального состояния и анатомии сердца, а также снижению в миокарде микроциркуляции крови и лимфы. Есть все основания полагать, что выявленные изменения могут лежать в основе патогномоничного для этого синдрома нарушения электрической стабильности кардиомиоцитов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Funding

The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Крыжановский Сергей Александрович

Автор, ответственный за переписку

д. м. н., зав. лабораторией фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских
и фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
e-mail: kryzhanovskij_sa@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
РИНЦ SPIN-код: 6596-4865

Sergey A. Kryzhanovskii

Corresponding author

PhD, Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: kryzhanovskij_sa@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
RSCI SPIN code: 6596-4865

Цорин Иосиф Борисович

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских
и фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
РИНЦ SPIN-код: 4015-3025

Iosif B. Tsorin

PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Moscow,
Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
RSCI SPIN code: 4015-3025

Ионова Екатерина Олеговна

к. м. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских
и фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>
РИНЦ SPIN-код: 5042-1952

Ekaterina O. Ionova

PhD, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Moscow,
Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>
RSCI SPIN code: 5042-1952

Вититнова Марина Борисовна

к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских
и фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
РИНЦ SPIN-код: 1901-8919

Marina B. Vititnova

PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Moscow,
Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
RSCI SPIN code: 1901-8919

Симоненко София Алексеевна

лаборант-исследователь лаборатории
фармакологии кровообращения ФГБНУ
«ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация
РИНЦ SPIN-код: 3075-6496

Sophia A. Simonenko

laboratory research assistant of laboratory of cir-
culation pharmacology Federal research center for
innovator and emerging biomedical and pharma-
ceutical technologies, Moscow, Russian Federation
RSCI SPIN code: 3075-6496

Колик Лариса Геннадьевна

д. б. н., профессор РАН, руководитель
лаборатории лекарственной токсикологии
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>
РИНЦ SPIN-код: 9126-6922

Larisa G. Kolik

PhD, Dr. Sci. (Biology), Professor of the Russian
Academy of Sciences, Head of laboratory of medicinal
toxicology Federal research center for innovator
and emerging biomedical and pharmaceutical
technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>
RSCI SPIN code: 9126-6922

Список литературы / References

1. Jain A, Yelamanchili VS, Brown KN, Goel A. Holiday Heart Syndrome. 2024 Jan 16. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. PMID: 30725870.
2. Cecchi F, Sgalambro A, Baldi M, et al. Microvascular dysfunction, myocardial ischemia, and progression to heart failure in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res.* 2009 Dec;2(4):452-61. doi: 10.1007/s12665-009-9142-5.
3. Selthofer-Relat K, Mihaj M, Kibel A, et al. Coronary Microcirculatory Dysfunction in Human Cardiomyopathies: A Pathologic and Pathophysiologic Review. *Cardiol Rev.* 2017 Jul/Aug;25(4):165-178. doi: 10.1097/CRD.0000000000000140.
4. Xue F, Zhao S, Tian H, et al. Two way workable microchanneled hydrogel suture to diagnose, treat and monitor the infarcted heart. *Nat Commun.* 2024 Jan 29;15(1):864. doi: 10.1038/s41467-024-45144-y.
5. Spezzacatene A, Sinagra G, Merlo M, et al. Arrhythmogenic Phenotype in Dilated Cardiomyopathy: Natural History and Predictors of Life-Threatening Arrhythmias. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(10):e002149. doi: 10.1161/JAHA.115.002149.
6. Wess G. Screening for dilated cardiomyopathy in dogs. *J Vet Cardiol.* 2022;40:51-68. doi: 10.1016/j.jvc.2021.09.004.
7. Haugaa KH, Grenne BL, Eek CH, et al. Strain echocardiography improves risk prediction of ventricular arrhythmias after myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2013;6(8):841-50. doi: 10.1016/j.jcmg.2013.03.005.
8. Spannbauer A, Traxler D, Zlabinger K, et al. Large Animal Models of Heart Failure With Reduced Ejection Fraction (HFrEF). *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:117. doi: 10.3389/fcvm.2019.00117.
9. Смирнова С.Л., Рощевская И.М., Столярук В.Н., и др. Деполяризация предсердий крыс при экспериментальном моделировании синдрома “праздничного сердца. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.* 2020;495(6):616-619. [Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Stolyaruk VN, et al. Epolarization of the rats' atria in experimental simulation of the holiday heart syndrome. *Doklady Rossijskoj akademii nauk. Nauki o zhizni.* 2020;495(6):616-619. (In Russ.).] doi: 10.31857/S2686738920060232.
10. 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):1440-63. doi: 10.1016/j.echo.2005.10.005.
11. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем : колебания, информация, нелинейность: руководство для врачей / А. И. Крупинин, В. В. Сидоров. — Москва: Книжный дом «Либроком», 2014. 489 с. [Functional diagnostics of the state of microcirculatory-tissue systems. Vibrations, information, nonlinearity. Krupatkin AI, Sidorov VV. Moscow: Book house "Librocom". 2014. (In Russ.)]. ISBN: 978-5-397-04451-6.
12. Сидоров В.В., Рыбаков Ю.Л., Гукасов В.М. Диагностический подход для оценки состояния микроциркуляторно-тканевой системы с использованием лазерных технологий и температурной функциональной пробы. *Иноватика и экспертиза.* 2018; Вып. 1(22):135-142. [Sidorov VV, Rybakov YuL, Gukasov VM. Diagnostic approach for estimation of the state of microcirculator-tissue system using laser technologies and temperature functional sample. *Innovation and expertise.* 2018; Issue 1(22): 135-142. (In Russ.)].
13. Márquez MF, Gómez-Flores J, Aranda-Fausto A, et al. Avances recientes en la fisiopatología de la fibrilación auricular [Recent advances in the pathophysiology of atrial fibrillation]. *Arch Cardiol Mex.* 2009 Dec;79 Suppl 2:18-25. Spanish.
14. Grubitzsch H, Haverkamp W. Atrial Remodelling : Role in Atrial Fibrillation Ablation. *J Atr Fibrillation.* 2012 Dec 16;5(4):691. doi: 10.4022/jafib.691.
15. Georgiadis N, Tsarouhas K, Rezaee R, et al. What is considered cardiotoxicity of anthracyclines in animal studies. *Oncol Rep.* 2020 Sep;44(3):798-818. doi: 10.3892/or.2020.7688. Epub 2020 Jul 14. Erratum in: *Oncol Rep.* 2020 Oct;44(4):1772. doi: 10.3892/or.2020.7717.
16. Малов Ю.С., Обрезан А.Г., Косарев М.М. Диагностика хронической сердечной недостаточности с использованием ультразвукового исследования сердца: все ли мы применяем в практической деятельности? *Вестник СПбГУ.* 2010; Сер. 11(2):23-31. [Malov YuS, Obrezan AG, Kosarev MM. Diagnosis of chronic heart failure using cardiac ultrasound: do we use everything in practice? *Vestnik of St. Petersburg State University.* 2010; Ser.11(2):23-31. (In Russ.)].
17. Slovinski AP, Hajjar LA, Ince C. Microcirculation in Cardiovascular Diseases. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2019 Dec;33(12):3458-3468. doi: 10.1053/j.jvca.2019.08.008.
18. Manolis TA, Apostolopoulos EJ, Manolis AA, et al. The proarrhythmic conundrum of alcohol intake. *Trends Cardiovasc Med.* 2022 May;32(4):237-245. doi: 10.1016/j.tcm.2021.03.003.



Особенности поведения крыс Вистар на моделях расстройств аутистического спектра, вызванных пренатальным или постнатальным введением вальпроата натрия

© Савинкова Е. В., Капица И. Г., Воронина Т. А.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Сложности диагностики и лечения расстройств аутистического спектра (PAC) обусловлены их неизвестной этиологией и патофизиологией. Изучение моделей PAC, вызванных воздействием вальпроата натрия (ВН), имеет важное значение для разработки эффективной фармакологической коррекции этого расстройства.

Цель. Целью исследования являлась оценка влияния пренатального и постнатального воздействия ВН на развитие аутичноподобного поведения у крыс линии Вистар для дальнейшего выбора целесообразного терапевтического воздействия.

Методы. Потомство крыс линии Вистар получали ВН на 12,5-й день пренатального развития или постнатально на 14-й день. Проводили оценку социального поведения, тревожности, рабочей памяти, оборонительного видового поведения, исследовательской и двигательной активности.

Результаты. Пренатальное воздействие ВН привело к снижению социального взаимодействия, повышению тревожности, нарушению видового оборонительного поведения и уменьшению двигательной активности у самцов крыс. У самок крыс с ВН, введённым пренатально, отмечались социальный дефицит, повышение тревожности и гиполокомоция, а также нарушения в когнитивной сфере, но не предпочтение кaversивному запаху. При постнатальном воздействии ВН на самцов и самок крыс не наблюдалось существенных изменений в социальном взаимодействии и видовом оборонительном поведении, однако животные показали снижение двигательной активности. У самок, получавших ВН постнатально, отмечалось ухудшение рабочей памяти и снижение исследовательского поведения.

Заключение. Как пренатальное, так и постнатальное воздействие ВН вызывает нарушения поведения, сходные с PAC, и имеет гендерные особенности, что может определить направление фармакологической коррекции заболевания.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра; фетальный вальпроатный синдром; пренатальное воздействие вальпроата натрия; крысы линии Вистар; социальное взаимодействие; тревожность; аверсивный запах; когнитивные функции; исследовательское поведение; двигательная активность

Для цитирования:

Савинкова Е. В., Капица И. Г., Воронина Т. А. Особенности поведения крыс Вистар на моделях расстройств аутистического спектра, вызванных пренатальным или постнатальным введением вальпроата натрия. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(2):34–42. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-34-42>. EDN: HLEVUO

Поступила: 06.05.2024. В доработанном виде: 20.05.2024. Принята к печати: 17.06.2024. Опубликована: 30.06.2024.

Behavioral features of Wistar rats in models of autism spectrum disorders induced by prenatal or postnatal administration of sodium valproate

© Elena V. Savinkova, Inga G. Kapitsa, Tatiana A. Voronina

Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract

Relevance. The complexity of diagnosing and treating autism spectrum disorders (ASD) is attributed to their unknown etiology and pathophysiology. The investigation of ASD models induced by sodium valproate (VPA) holds significant importance in the development of effective pharmacological interventions for this disorder.

Objective. The aim of the study was to assess the impact of prenatal and postnatal exposure to VPA on the development of autism-like behavior in Wistar rats for further selection of appropriate therapeutic interventions.

Methods. Offspring of Wistar rats were exposed to VPA on the 12.5th day of prenatal development or postnatally on the 14th day. Evaluation included assessment of social behavior, anxiety, working memory, species-typical defensive behavior, exploratory, and locomotor activity.

Results. Prenatal VPA exposure led to reduced social interaction, increased anxiety, disruption of species-typical defensive behavior, and decreased locomotor activity in male rats. Female rats prenatally exposed to VPA exhibited social deficits, increased anxiety, hypolocomotion, and cognitive impairments, albeit without displaying aversive odor preference. Postnatal VPA exposure in male and female rats did not significantly alter social interaction and species-typical defensive behavior; however, animals exhibited reduced locomotor activity. Postnatally VPA-exposed female rats demonstrated worsened working memory and decreased exploratory behavior.

Conclusion. Both prenatal and postnatal exposure to VPA elicits behavioral disturbances resembling ASD, with gender-specific nuances, which may guide the direction of pharmacological interventions for the disorder.

Keywords: autism spectrum disorders; fetal valproate syndrome; postnatal valproate; Wistar rats; social interaction; anxiety; aversive odor; cognitive functions; exploratory behavior; locomotor activity

For citations:

Savinkova EV, Kapitsa IG, Voronina TA. Behavioral features of Wistar rats in models of autism spectrum disorders induced by prenatal or postnatal administration of sodium valproate. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(2):34–42. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-34-42>. EDN: HLEVUO

Received: 06.05.2024. **Revision received:** 20.05.2024. **Accepted:** 17.06.2024. **Published:** 30.06.2024.

Введение / Introduction

Расстройства аутистического спектра (PAC) — нарушение нейроразвития, сопровождающееся дефицитом в сферах социализации и коммуникации, ограниченностью интересов и стереотипным поведением [1]. Диагностика и лечение PAC является сложной задачей, особенно в контексте высокой коморбидности с умственной отсталостью, эпилептиформными проявлениями, микроаномалиями, пороками развития [2], тревожными, депрессивными, обессиально-компульсивными расстройствами, синдромом дефицита внимания и гиперактивности [3], а также с другими широко распространёнными поведенческими особенностями, такими как сенсорные и двигательные нарушения [4].

Этиология и патофизиология PAC неизвестны, однако все больше подтверждений находит важность роли как генетических, так и эпигенетических факторов, а также факторов окружающей среды в появлении клинического фенотипа заболевания. Среди внешних факторов, оказывающих влияние на формирование PAC, особое внимание привлекает вальпроат натрия (ВН) — препарат, широко используемый в медицине для лечения эпилепсии, биполярного аффективного расстройства, мигрени [5]. Приём ВН во время беременности тесно связан с возникновением пороков развития у плода [6]. Являясь ингибитором гистондеацетилаз и эпигенетическим модулятором, ВН обладает способностью модулировать активность генов, повреждать ДНК, нарушать энергетический обмен в митохондриях и способствовать развитию окислительного стресса. Являясь мощным тератогеном, ВН вызывает у плода нарушения, обозначенные как фетальный вальпроатный синдром (ФВС), который включает дефекты нервной трубки, задержку нервного развития, дисморфические признаки, сердечные аномалии, когнитивные дефекты и некоторые другие проявления PAC [7]. Тератогенный эффект вальпроатов обусловлен высокой степенью их диффундирования через плаценту, в результате чего их концентрация в крови плода в несколько раз превышает таковую в крови матери, что приводит к прямому воздействию на митохондрии, выражющемуся в нарушении клеточного метаболизма [8]. Показано, что вальпроаты влияют на экспрессию генов *NANOG*, *OCT4* и *PAX6*, участвующих в эмбриональном разви-

тии, и вызывают нарушение метилирования лизина 4 и 27 в Н3 гистоне, что приводит к нарушению закрытия нервной трубки на 22–23-й день гестации и формированию врождённых пороков ЦНС [9, 10].

Воздействие ВН в первый триместр беременности может вызвать у плода нарушение электронной транспортной цепи и накопление свободных радикалов, что приводит к окислительному стрессу. Этот процесс сопровождается повреждением белков, липидов и ДНК и увеличивает вероятность повреждений и апоптоза клеток, что может вызвать врождённые дефекты, включая дефекты нервной трубки [11].

После прохождения эмбриональной фазы и органогенеза (второй триместр), в третьем триместре происходит интенсивное усиление синаптогенеза и уточнение нейронных связей в мозге плода. Негативное воздействие ВН в этот период связано с усилением тормозной нейротрансмиссии через воздействие на уровни гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и модуляцией потенциалзависимых ионных каналов [12], что приводит к дисбалансу тормозной и возбуждающей систем и нарушает нормальное развитие мозга плода [13].

Для моделирования PAC с применением ВН используется несколько схем. Одним из широко используемых приёмов является моделирование ФВС, который впервые был описан в 1984 г. *DiLiberti JH* при анализе особенностей фенотипа и психоневрологического развития 7 детей, матери которых принимали ВН для лечения эпилепсии на протяжении всей беременности [14]. Связь между внутриутробным воздействием ВН и развитием PAC побудила *Rodier PM* и его коллег изучить эффекты пренатального введения вальпроата в экспериментах на крысах [15]. Наиболее яркие нарушения PAC у крыс были выявлены при введении ВН на 12,5-й день гестации (E12,5), что соответствует первому триместру беременности человека [15–17]. В этот период у крыс происходит закрытие нервной трубки и формирование двигательных ядер ствола мозга [17, 18].

В раннем послеродовом периоде (P0–14) состояние развивающихся нейросенсорных систем грызунов примерно соответствует особенностям, связанным с развитием мозга человека в третьем триместре [4, 17]. 14-й день постнатального развития (P14) крыс определяется как критический с повышенной чувствительностью к нейротоксичности,

поскольку в этот период практически завершено формирование мозжечка, завершены процессы пролиферации и миграции, но дифференцировка и миграция гиппокампа и стриатума, а также синапто- и глиогенез продолжаются, и воздействие ВН приводит к регрессу сформированных двигательных и когнитивных навыков [19, 20].

Целью исследования / The purpose of the study являлась оценка влияния пренатального и постнатального воздействия вальпроата натрия на развитие аутичноподобного поведения у крыс линии Вистар для дальнейшего выбора целесообразного терапевтического воздействия.

Материал и методы / Materials and methods

Работа проведена на потомстве крыс линии Вистар, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская область). Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде при 12-часовом световом режиме в соответствии с ГОСТ 33215 и 33216. Эксперименты проводили в соответствии с положениями, представленными в «Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» (Приложение к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 года №33) и одобрена этической комиссией (протокол № 01 от 18 января 2023 г.).

В работе использовали натриевую соль вальпроевой кислоты (вальпроат натрия, ВН) (Sigma-Aldrich, Индия) и физиологический раствор (натрия хлорид, раствор для инфузий 0,9 %).

Моделирование РАС проводили, используя пренатальное введение на Е12,5 ВН в дозе 600 мг/кг однократно внутрибрюшинно (в/б) [15] (модель ФВС) и постнатальное введение на Р14 ВН в дозе 400 мг/кг однократно подкожно (п/к) [19]. Контрольным животным вводили физиологический раствор в эквивалентном объёме (0,2 мл на 100 г массы тела) и в том же режиме, что и группам, получавшим ВН. В работе использовали крыс обеих гендерных групп. Число животных в группе и возраст, при котором были проведены тесты, указаны ниже.

Двигательную и исследовательскую активность оценивали в установке «Открытое поле» (НПК «Открытая Наука», Россия), которая представляет собой арену диаметром 90 см с бортиком высотой 38 см и полом, расчерченным на 19 секторов и имеющим 13 отверстий («норки») по 4 см в диаметре. Животное помещали на периферию установки и регистрировали число посещённых секторов и заглядываний в норки в течение 5 мин.

Оперативную (рабочую) память у крыс оценивали в teste «У-лабиринт», установка для которого

представляет собой лабиринт с тремя серыми непрозрачными пластиковыми рукавами ($40 \times 8 \times 15$ см), расположеннымными друг от друга под углом 120° и обозначаемыми как А, В, С (НПК «Открытая Наука», Россия). Животное помещали в центр лабиринта и регистрировали количество спонтанных последовательных посещений трёх рукавов (триплетов) и двигательную активность (общее количество посещённых рукавов) в течение 5 мин [21].

Оценку поведения крыс в ответ на предъявление аверсивного запаха оценивали в установке «У-лабиринт». В один из 3 рукавов лабиринта помещали чашку Петри с фильтровальной бумагой размером 1×1 см, смоченной 0,1 мл 1 % раствора мочи лисы (Minnesota Brand Red Fox Urine), а два других рукава (А и В) оставляли свободными. Животное сажали в центр лабиринта и в течение 5 мин регистрировали количество заходов в каждый рукав, а также число подходов к источнику запаха на расстояние менее 2 см и длительность контакта с ним. После каждого тестирования бумагу с запахом обновляли, а чашку Петри переставляли в другой рукав. По полученным результатам рассчитывали коэффициент предпочтения рукава с запахом по отношению:

$$K = C / (A + B + C) \times 100,$$

где С — число заходов в рукав с запахом; А и Б — число заходов в рукава без запаха [22].

Социальное поведение крыс оценивали в «Трёхкамерном teste», установка для которого представляет собой камеру с непрозрачными стенками длиной 60 см, шириной 25 см и высотой 30 см, поделённой прозрачными перегородками с дверцами на три равных отсека. Тестируемое животное сажали в центральный отсек установки на 10 мин, давая свободно исследовать его, затем животное блокировали в центральном отсеке, а в крайних размещали цилиндры со стенками из металлической сетки (11 см в высоту, 9 см в диаметре) в один из которых помещали «социальный объект» (СО) — незнакомую крысу того же пола и возраста, что и тестируемое животное, а второй цилиндр оставляли пустым (ненасоциальный объект). Далее в течение 10 мин оценивали начало движения тестируемого животного, латентное время заходов в отсеки, число заходов и продолжительность пребывания в них, длительность обследования объектов (подход на расстояние менее 2 см, обнюхивание и т. д.) [23].

Тестирование крыс, которым пренатально или постнатально вводили ВН проводили в максимально близкие возрастные периоды.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «GraphPad Prism V. 8.4.3». Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена, даль-

нейшую обработку данных проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна–Уитни. Результаты представлены как среднее \pm ошибка среднего (Mean \pm SEM) или в виде данных, выраженных в %. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты / Results

Пренатальное введение ВН не оказalo влияния на поведение самцов и самок крыс на 36-й день постнатального развития (Р36) в тесте «Открытое поле». Оценка влияния постнатального введения ВН на поведение крыс на Р40 в тесте «Открытое поле» выявила снижение двигательной активности в сравнении с группой «Контроль», что выражалось в уменьшении числа посещённых секторов в 1,4 раза у самцов ($46,4 \pm 3,5$ vs $63,5 \pm 6,5$ ($p < 0,05$)), и в 1,3 раза — у самок ($43,1 \pm 4,9$ vs $57,6 \pm 5,2$ ($p = 0,075$)). Кроме того, у самок крыс, постнатально получавших ВН, отмечено снижение исследовательской активности в сравнении с показателями группы «Контроль», что выражалось в уменьшении в 1,7 раза числа заглядываний в норки ($6,6 \pm 0,8$ vs $11,4 \pm 1,9$ ($p < 0,05$)).

В тесте У-лабиринт самки крыс (Р38), пренатально получившие ВН, демонстрировали нарушение рабочей памяти и снижение двигательной активности, что выражалось в уменьшении в 1,5 раза числа триплетов и в 1,3 раза числа визитов в рукава по сравнению с группой «Контроль» (рис. 1).

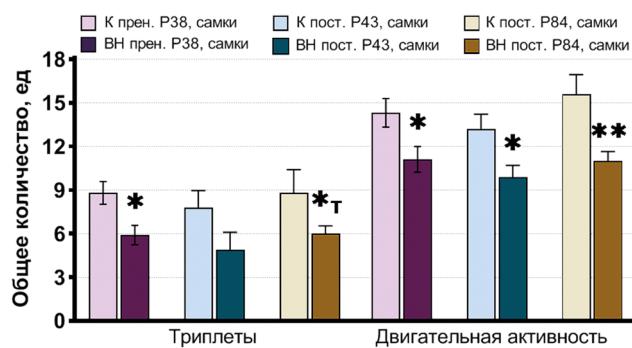


Рис. 1. Влияние пренатального и постнатального введения вальпроата натрия на поведение самок крыс Вистар в тесте «У-лабиринт»

Fig. 1. Effect of prenatal and postnatal administration of sodium valproate on the behavior of female Wistar rats in the "Y-maze" test

Примечания: *_t, * — $p = 0,085$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, соответственно, по сравнению с группой «Контроль»; К — контроль; ВН — вальпроат натрия; прен. — пренатальное введение на Е12,5; пост. — постнатальное введение на Р14

Notes: *_t, * — $p = 0,085$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, respectively, compared to the "Control" group; K — Control; BH — sodium valproate; pren. — prenatal administration on day E12,5; post. — postnatal administration on day P14

Постнатальное введение ВН вызывало снижение в 1,5 раза числа триплетов у самок крыс на Р43 по сравнению с группой «Контроль» (рис. 1), и это изменение достигало статистической значимости при тестировании на Р84.

Самки крыс, получавших ВН на Р14, аналогично группе самок с пренатальным введением ВН, демонстрировали уменьшение в 1,3 и 1,4 раза двигательной активности на Р43 и Р84, соответственно, по сравнению с группой «Контроль» (рис. 1).

Поведение самцов крыс, пренатально и постнатально получавших ВН, в тесте «У-лабиринт» не отличалось от поведения животных контрольных групп.

У самцов и самок крыс Вистар (Р40), пренатально получавших ВН, по сравнению с показателями соответствующих контрольных групп, отмечался дефицит социального взаимодействия, который проявлялся в снижении длительности контакта с СО в 5,8 и 2,7 раз, соответственно, и в увеличении в 3,1 раза латентного времени захода в отсек с СО у самцов крыс, а также рост уровня тревожности, который выражался в увеличении в 4,8 и 2,7 раз латентного времени начала движения, в 2,3 и 1,8 раз длительности нахождения в стартовом отсеке, соответственно (рис. 2).

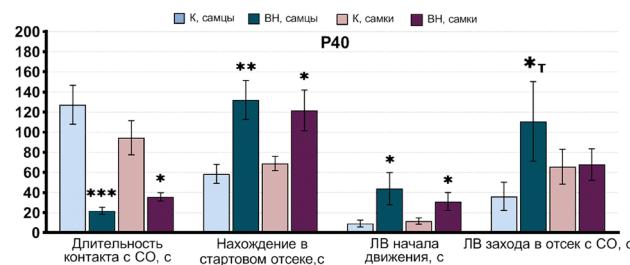


Рис. 2. Влияние пренатального введения вальпроата натрия на поведение крыс Вистар в тесте «Социальное взаимодействие»

Fig. 2. Effect of prenatal administration of sodium valproate on the behavior of Wistar rats in the "Social interaction" test

Примечания: *_t, * — $p < 0,09$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, соответственно, по сравнению с группой «Контроль»; ВН — вальпроат натрия; К — контроль; СО — социальный объект; ЛВ — латентное время.

Notes: *_t, * — $p < 0,09$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectively, compared to the "Control" group; BH — sodium valproate; K — Control; CO — social object; LP — latency period

Постнатальное введение ВН не выявило значимых различий в тесте «Социальное взаимодействие» у самцов и самок Вистар (табл. 1).

Оценка поведения самцов крыс Вистар в установке «У-лабиринт» в ответ на предъявление запаха хищника выявила разнонаправленные реакции животных в зависимости от пренатального или постнатального введения ВН. Так, самцы крыс, получавшие ВН пренатально, демонстрировали повышение в 1,3 раза предпочтения рукава с аверсивным запахом (%), тогда как у крыс, которым ВН вводили на Р14,

отмечалось снижение в 1,4 раза этого показателя, что подкреплялось уменьшением в 1,8 раза числа заходов в этот рукав ($p < 0,05$), по сравнению с соответствующей контрольной группой. Однако в обеих моделях у самцов крыс отмечалось снижение двигательной активности по сравнению с группой «Контроль» (табл. 2).

У самок крыс, пренатально получавших ВН, значимых отличий по сравнению с контрольной группой по реакции на аверсивный стимул не наблюдалось (табл. 3).

Самки крыс, которым ВН вводили пренатально, аналогично самцам, избегали аверсивный запах, что выразилось в снижении в 1,9 и 2,5 раз количества

Таблица 1

Влияние постнатального введения ВН на поведение крыс Вистар в тесте «Социальное взаимодействие» на P51 (самцы) и P57 (самки)

Table 1

Effect of postnatal administration of sodium valproate on the behavior of Wistar rats in the “Social interaction” test on P51 (males) and P57 (females)

Показатели / Группы, число крыс в группе (n)	«Контроль», самцы, n = 8	«ВН», самцы, n = 11	«Контроль», самки, n = 8	«ВН», самки, n = 7
Длительность контакта с СО, с	59,9 ± 15,5	43,9 ± 11,6	104,7 ± 30,5	111,7 ± 37,8
Длительность нахождения в стартовом отсеке, с	224,3 ± 37,4	285,4 ± 68,2	232,0 ± 62,7	195,1 ± 64,6
ЛВ начала движения, с	3,1 ± 0,6	4,6 ± 1,3	42,0 ± 40,5	4,5 ± 2,6
ЛВ подхода к СО, с	9,2 ± 2,7	25,5 ± 11,6	85,4 ± 76,3	52,9 ± 42,1

Примечания: данные представлены в виде среднего и стандартных ошибок среднего; СО — социальный объект; ЛВ — латентное время.

Notes: the data are presented in the form of an average and a standard error; CO — social object; LV — latency period.

Таблица 2

Влияние пренатального и постнатального введения ВН на поведение самцов крыс Вистар в тесте «У-лабиринт с аверсивным запахом» на P82 и P86, соответственно

Table 2

Effect of prenatal and postnatal administration of sodium valproate on the behavior of male Wistar rats in the “Y-maze with smell aversion” test on P82 and P86, respectively

Показатели / Группы, число крыс в группе (n)	ВН пренатально, самцы		ВН постнатально, самцы	
	«Контроль», n = 16	«ВН», n = 21	«Контроль», n = 21	«ВН», n = 20
Предпочтение рукава с запахом, %	28,9 ± 2,2	38,2 ± 1,6*	35,4 ± 3,4	26,0 ± 4,3
Заходы в рукав с запахом, ед.	2,5 ± 0,3	2,2 ± 0,4	3,9 ± 0,4	2,2 ± 0,4*
Двигательная активность, ед.	8,5 ± 0,8	6,0 ± 0,8*	11,3 ± 1,1	7,6 ± 1,0*

Примечания: данные представлены в виде среднего и стандартных ошибок среднего; * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль»; ВН — вальпроат натрия.

Notes: the data are presented in the form of an average and a standard error; * — $p < 0,05$ compared to the “Control” group; BH — sodium valproate.

Таблица 3

Влияние пренатального и постнатального введения ВН на поведение самок крыс Вистар в тесте «У-лабиринт с аверсивным запахом» на P82 и P86, соответственно

Table 3

Effect of prenatal and postnatal administration of sodium valproate on the behavior of female Wistar rats in the “Y-maze with smell aversion” test on P82 and P86, respectively

Показатели / Группы, число крыс в группе (n)	ВН пренатально, самки		ВН постнатально, самки	
	«Контроль», n = 8	«ВН», n = 7	«Контроль», n = 21	«ВН», n = 20
Предпочтение рукава с запахом, %	32,5 ± 2,6	34,5 ± 2,2	32,3 ± 3,3	32,1 ± 3,4
Заходы в рукав с запахом, ед.	4,3 ± 0,7	4,0 ± 0,4	3,6 ± 0,2	3,4 ± 0,4
Подходы к источнику запаха, ед.	3,9 ± 0,5	5,0 ± 0,8	6,2 ± 1,0	3,3 ± 0,7*
Длительность контакта с источником запаха, с	12,7 ± 3,7	19,3 ± 3,6	50,6 ± 13,4	20,6 ± 5,8*
Двигательная активность, ед.	12,9 ± 1,4	11,4 ± 0,8	11,4 ± 0,9	10,9 ± 0,8

Примечания: Данные представлены в виде среднего и стандартных ошибок среднего; * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль»; ВН — вальпроат натрия.

Notes: the data are presented in the form of an average and a standard error; * — $p < 0,05$ compared to the “Control” group; BH — sodium valproate.

подходов к его источнику и длительности контакта с ним, соответственно, по сравнению с группой «Контроль» (см. табл. 3).

Обсуждение / Discussion

Проведено изучение влияния пренатального (на Е12,5) введения ВН в дозе 600 мг/кг в/б и постнатального (на Р14) в дозе 400 мг/кг п/к, моделирующего аутичноподобное поведение у крыс линии Вистар. Показано, что как пренатальное, так и постнатальное введение ВН крысам Вистар в критические периоды развития приводит к нарушениям поведения, имеющими сходство с симптомами характерными для РАС. Наряду с этим, выявлены гендерные различия формирования РАС. Так, у самцов крыс Вистар пренатальное воздействие ВН вызывало снижение социального взаимодействия, повышение тревожности и нарушение видового оборонительного поведения, связанного с избеганием аверсивного запаха хищника, и снижение двигательной активности.

Самки крыс, в отличие от самцов, в условиях модели РАС, вызванной пренатальным введением ВН, не предпочитали аверсивный запах, а проявляли ярко выраженную реакцию его избегания в тесте У-образного лабиринта, но демонстрировали сходный с самцами социальный дефицит, повышение тревожности, гиполокомоцию и нарушения в когнитивной сфере.

Сходные проявления РАС (снижение социального взаимодействия и двигательной активности, повышение тревожности, когнитивный дефицит) у самцов крыс, пренатально получавших ВН, были получены и другими авторами [5, 24–26].

В эксперименте с постнатальным (Р14) введением ВН самцам и самкам крыс Вистар нарушений социального взаимодействия и видового оборонительного поведения, в основе которого лежало восприятие обонятельных стимулов, не наблюдалось, однако у животных отмечалось снижение двигательной активности. Кроме того, у самок крыс, получавших ВН на Р14, отмечалось ухудшение рабочей памяти и снижение исследовательского поведения.

Показано, что воздействие ВН в раннем постнатальном периоде с Р6 по Р12 (150 мг/кг) вызывало у крыс Лонг Эванс нарушения мелкой моторики и сенсорно-моторной системы, что часто (до 70 %) наблюдается и у людей с РАС (до 70 %) [4].

Посмертные нейровизуализационные исследования у пациентов с РАС и на животных моделях выявили нейроанатомические изменения в различных областях мозга, особенно в префронтальной коре, отвечающей за социальное функционирование, в гиппокампе, играющим ключевую роль в осуществлении эмоциональной регуляции, включая тревогу и депрессию, ориентировочных рефлексов, в обуче-

нии и обработке новой информации и мозжечке — т. е. в областях мозга, связанных с поведенческими аномалиями, наблюдаемыми при РАС [7, 27]. У пациентов с аутизмом наблюдаются многочисленные изменения в мозжечке, включающие потерю клеток Пуркинье, усиление окислительного стресса и дисфункцию ГАМКергической системы, которые могут быть ответственны за нарушения двигательных (моторика, походка, поза) и сенсорных функций, а также функций памяти и речи [24, 28].

Мозжечок играет важную роль и в регуляции социального поведения, посредством влияния на отвечающую за этот аспект, а также когнитивные функции, префронтальную кору и эмоции [28]. Кроме того, посредством реципрокной связи между миндалевидным телом, префронтальной корой и мозжечком, последний принимает участие в регуляции тревоги, модулируя реактивность у людей, уязвимых к тревоге [29]. Постнатальный период с Р6-Р28 у крыс характеризуется интенсивной клеточной пролиферацией и синаптогенезом в различных структурах головного мозга, участвующих в том числе, в процессах обучения и памяти [30].

Показано, что пренатальное воздействие ВН у самцов крыс Вистар вызывает радикальные патологические изменения в ультраструктурах синапсов с нарушением регуляции ключевых пре- и постсинаптических структурных и функциональных белков, что может вызывать нарушения клеточной нейротрансмиссии и представлять собой основное повреждение, ответственное за аутичноподобное поведение у потомства [25].

В патофизиологии РАС одну из фундаментальных ролей играет нарушение глутаматергической нейротрансмиссии [31]. Пренатальное воздействие ВН усиливает возбуждающую глутаматергическую и нарушает тормозную ГАМКергическую синаптическую передачу с преувеличенным апоптозом гиппокампа [24]. Захват глутамата из синаптического пространства у грызунов осуществляется астроцитами с помощью переносчика глутамата 1 — GLT-1, экспрессия которого при РАС нарушается, что сопровождается чрезмерной синаптической возбудимостью с появлением гипервозбудимости нейронов, патологического повторяющегося поведения и ослаблением когнитивных функций [32].

Основным активатором экспрессии гена астроцитов GLT-1 является фосфорилированный белок, цАМФ-зависимый клеточный фактор транскрипции p-CREB, который играет решающую роль в формировании дендритов и росте шипиков, а также в пластичности нейронов и формировании долговременной памяти, регулирующий транскрипцию определенных генов, необходимых для выживания нейронов, в том числе, таких как нейротрофический фактор головного мозга (BDNF). Отмечались более низкие уровни CREB у аутистов с увеличением тя-

жести симптомов [33]. Показано, что BDNF стимулирует свой рецептор — киназу тропомиозинового рецептора B (TrkB), что приводит к активации регулируемой внеклеточными сигналами киназы ERK с последующим фосфорилированием/активацией CREB, что может представлять собой петлю положительной обратной связи [32]. BDNF является сигнальной молекулой, которая экспрессируется в головном мозге, причём этот процесс регионально избирателен и динамически меняется в процессе развития [34]. Функции BDNF включают регуляцию нейрогенеза, гликогенеза и синаптогенеза, а также нейропротекцию и контроль коротко- и долговременных синаптических взаимодействий, которые влияют на механизмы памяти и познания [35].

Нарушение экспрессии BDNF обнаруживается у пациентов с РАС [36]. Показано, что BDNF снижает уровни гиперфосфорилированного тау-белка, который может играть ключевую роль в когнитивной дисфункции у аутистов, а при пренатальном воздействии ВН отмечалось увеличение внутринейрональных отложений гиперфосфорилированного белка «тау», что вызывало нарушение синаптической передачи и повреждение нейронов [32]. Показано, что ВН может влиять на экспрессию ключевых генов, которые поддерживают развитие нейронов, в том числе гена *BDNF* [37, 38]. У крыс, получавших высокие дозы ВН (600 мг/кг) во время пренатального

периода (E8), наблюдалась повышенная экспрессия *BDNF* в нервной трубке [39]. Аналогично, в опытах *in vitro* в культуре корковых нейронов постнатальных крыс выявлено повышение уровней мРНК *bdnf* после применения вальпроата [38]. Было обнаружено, что у крыс, получавших ВН в постнатальный период, наблюдалось снижение экспрессии гена *bdnf* уже в течение 24 часов [37, 40]. Выявлено уменьшение поведенческих нарушений на фоне приёма арипипразола у детей-аутистов с лёгким и умеренным когнитивным дефицитом при увеличении содержания BDNF и p-CREB в нейрональных клетках HT22, а также ослабление поведенческих изменений и окислительного стресса у грызунов на моделях РАС, улучшение речи, памяти, социального взаимодействия, уменьшение раздражительности, стереотипного поведения и гиперактивности у детей-аутистов и усиления передачи сигналов CREB/BDNF у крыс, подвергающихся хроническому стрессу [32].

Таким образом, как пренатальное, так и постнатальное введение ВН крысам Вистар в критические периоды развития приводит к нарушениям поведения, имеющими сходство с РАС при наличии ряда особенностей, в том числе гендерных, которые могут способствовать лучшему пониманию патофизиологии заболевания и определять направление фармакологической коррекции.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Савинкова Елена Владимировна

Автор, ответственный за переписку
аспирант, м. н. с. лаборатории фармакологии
психических заболеваний отдела
нейропсихофармакологии
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: savinkova_ev@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-7876-5977>

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Funding

The work was carried out without sponsorship.

Elena V. Savinkova

Corresponding author

Postgraduate student, Junior Researcher at the Laboratory of Pharmacology of Mental Diseases of the Department of Neuropsychopharmacology, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: savinkova_ev@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-7876-5977>

Капица Инга Геннадьевна

к. б. н., в. н. с., начальник отдела интеллектуальной собственности ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4487-0991>

Воронина Татьяна Александровна

д. м. н., профессор, г. н. с., руководитель отдела нейропсихофармакологии, заведующий лабораторией фармакологии психических заболеваний ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

Inga G. Kapitsa

PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Head of the Intellectual Property Department, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4487-0991>

Tatiana A. Voronina

PhD, Dr. Sci. (Med.), professor, Chief Scientific Officer, Head of the Department of Neuropsychopharmacology, Head of the Laboratory of Pharmacology of Mental Diseases, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

Список литературы / References

1. Rogge N, Janssen J. The economic costs of autism spectrum disorder: A literature review. *J Autism Dev Disord.* 2019;49(7):2873-2900. doi: 10.1007/s10803-019-04014-z.
2. Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet Lond Engl.* 2009;374(9701):1627-1638. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61376-3.
3. Hossain MM, Khan N, Sultana A, et al. Prevalence of comorbid psychiatric disorders among people with autism spectrum disorder: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Psychiatry Res.* 2020;287:112922. doi: 10.1016/j.psychres.2020.112922.
4. Reynolds S, Millette A, Devine DP. Sensory and motor characterization in the postnatal valproate rat model of autism. *Dev Neurosci.* 2012;34(2-3):258-267. doi: 10.1159/000336646.
5. Mirza R, Sharma B. Benefits of Fenofibrate in prenatal valproic acid-induced autism spectrum disorder related phenotype in rats. *Brain Res Bull.* 2019;147:36-46. doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.02.003.
6. Nucera B, Brigo F, Trinka E, Kalss G. Treatment and care of women with epilepsy before, during, and after pregnancy: a practical guide. *Ther Adv Neurol Disord.* 2022; 15:17562864221101687. doi: 10.1177/17562864221101687.
7. Roullet FI, Lai JKY, Foster JA. In utero exposure to valproic acid and autism—a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol Teratol.* 2013;36:47-56. doi: 10.1016/j.ntt.2013.01.004.
8. Kini U. Fetal valproate syndrome: A review. *Paediatr Perinat Drug Ther.* 2006;7:123-130. doi: 10.1185/146300906X112908.
9. Balmer NV, Weng MK, Zimmer B, et al. Epigenetic changes and disturbed neural development in a human embryonic stem cell-based model relating to the fetal valproate syndrome. *Hum Mol Genet.* 2012;21(18):4104-4114. doi: 10.1093/hmg/ddz239.
10. Vasilyeva TA, Voskresenskaya AA, Pozdnyeva R, et al. Pax6 gene characteristic and causative role of pax6 mutations in inherited eye pathologies. *Russian Journal of Genetics.* 2018;54(9):995-1002. doi: 10.1134/S1022795418090156.
11. Дмитренко Д.В., Шнайдер Н.А., Стропская И.Г. и др. Механизмы валпроато-индуцированного тератогенеза. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2017;(специальный выпуск 1):89-96. [Dmitrenko DV, Shnайдер НА, Стропская ИГ, et al. Mechanisms of valproate-induced teratogenesis. *Nevrologiya, Neiropsikhiiatriya, Psichosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics.* 2017; (Special Issue 1):89-96. (In Russ.)]. doi: 10.14412/2074-2711-2017-1S-89-96.
12. Rahman M, Awosika AO, Nguyen H. Valproic acid. In: *StatPearls.* 2023 [cited 2023 Oct 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559112/>.
13. Pohl-Guimaraes F, Krahe TE, Medina AE. Early valproic acid exposure alters functional organization in the primary visual cortex. *Exp Neurol.* 2011;228(1):138-148. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.12.025.
14. DiLiberti JH, Farndon PA, Dennis NR, Curry CJ. The fetal valproate syndrome. *Am J Med Genet.* 1984 Nov;19(3):473-81. doi: 10.1002/ajmg.1320190308.
15. Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, et al. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J Comp Neurol.* 1996 Jun 24;370(2):247-61. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2.
16. Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand K. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology.* 2007; 28(5):10.1016/j.neuro.2007.01.014. doi: 10.1016/j.neuro.2007.01.014.
17. Fereshetyan K, Chavushyan V, Danielyan M, Yenkyan K. Assessment of behavioral, morphological and electrophysiological changes in prenatal and postnatal valproate induced rat models of autism spectrum disorder. *Sci Rep.* 2021 Dec 6;11(1):23471. doi: 10.1038/s41598-021-02994-6.
18. Kim KC, Kim P, Go HS, et al. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett.* 2011;201(2):137-142. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.12.018.
19. Oguchi-Katayama A, Monma A, Sekino Y, et al. Comparative gene expression analysis of the amygdala in autistic rat models produced by pre- and post-natal exposures to valproic acid. *J Toxicol Sci.* 2013;38(3):391-402. doi: 10.2131/jts.38.391.
20. Wagner GC, Reuhl KR, Cheh M, et al. A new neurobehavioral model of autism in mice: Pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J Autism Dev Disord.* 2006;36(6):779-793. doi: 10.1007/s10803-006-0117-y.
21. Yusuf S, Adelaiye A, Abdulkarim A. Effect of Ziziphus mauritiana (L.) seed extracts on spatial recognition memory of rats as measured by the Y-maze test. *J Nat Prod.* 2009;2.
22. Hacquemond R, Choffat N, Jacquot L, Brand G. Comparison between low doses of TMT and cat odor exposure in anxiety- and fear-related behaviors in mice. *Behav Brain Res.* 2013;238:227-31. doi: 10.1016/j.bbr.2012.10.014.
23. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, et al. Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp JoVE.* 2011;(48):2473. doi: 10.3791/2473.
24. Elnahas EM, Abuelez SA, Mohamad MI, et al. Validation of prenatal versus postnatal valproic acid rat models of autism: A behavioral and neurobiological study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021;108:110185. doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.110185.
25. Gąsowska-Dobrowolska M, Cieślik M, Czapski GA, et al. Prenatal exposure to valproic acid affects microglia and synaptic ultrastructure in a brain-region-specific manner in young-adult male rats: relevance to autism spectrum disorders. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10):3576. doi: 10.3390/ijms21103576.
26. Mohammadi S, Asadi-Shekaari M, Basiri M, et al. Improvement of autistic-like behaviors in adult rats prenatally exposed to valproic acid through early suppression of NMDA receptor function. *Psychopharmacology (Berl).* 2020;237(1):199-208. doi: 10.1007/s00213-019-05357-2.

27. Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, et al. Autism spectrum disorder: Neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2017;134(4):537-566. doi: 10.1007/s00401-017-1736-4.
28. Morakotsriwan N, Wattanathorn J, Kirisattayakul W, Chaisiwamongkol K. Autistic-like behaviors, oxidative stress status, and histopathological changes in cerebellum of valproic acid rat model of autism are improved by the combined extract of purple rice and silkworm pupae. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3206561. doi: 10.1155/2016/3206561.
29. Olexová L, Štefánik P, Kršková L. Increased anxiety-like behaviour and altered GABAergic system in the amygdala and cerebellum of VPA rats — An animal model of autism. *Neurosci Lett*. 2016;629:9-14. doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.035.
30. Brusque AM, Mello CF, Buchanan DN, et al. Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development of rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999;64(3):529-534. doi: 10.1016/s0091-3057(99)00127-6.
31. Montanari M, Martella G, Bonsi P, Meringolo M. Autism spectrum disorder: Focus on glutamatergic neurotransmission. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3861. doi: 10.3390/ijms23073861.
32. Zohny SM, Habib MZ, Mohamad MI, et al. Memantine/Aripiprazole Combination Alleviates Cognitive Dysfunction in Valproic Acid Rat Model of Autism: Hippocampal CREB/BDNF Signaling and Glutamate Homeostasis. *Neurotherapeutics*. 2023 Mar;20(2):464-483. doi: 10.1007/s13311-023-01360-w.
33. Russo A, Albert M, Judith B. Decreased phosphorylated CREB and AKT in individuals with autism normalized after zinc therapy. *Acad J Pediatr Neonatol*. 2017;5(3):1-4. doi: 10.19080/AJPN.2017.05.555721.
34. Baquet ZC, Gorski JA, Jones KR. Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 2004 Apr 28;24(17):4250-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3920-03.2004.
35. Barbosa AG, Pratesi R, Paz GSC, et al. Assessment of BDNF serum levels as a diagnostic marker in children with autism spectrum disorder. *Sci Rep*. 2020 Oct 15;10(1):17348. doi: 10.1038/s41598-020-74239-x.
36. Spratt EG, Granholm AC, Carpenter LA, et al. Pilot Study and Review: Physiological Differences in BDNF, a Potential Biomarker in Males and Females with Autistic Disorder. *Int Neuropsychiatr Dis J*. 2015;3(1):19-26. doi: 10.9734/INDJ/2015/12118.
37. Bittigau P, Siffringer M, Ikonomidou C. Antiepileptic drugs and apoptosis in the developing brain. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;993:103-14; discussion 123-4. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07517.x.
38. Fukuchi M, Nii T, Ishimaru N, et al. Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neurosci Res*. 2009;65(1):35-43. doi: 10.1016/j.neures.2009.05.002.
39. Bennett GD, Włodarczyk B, Calvin JA, et al. Valproic acid-induced alterations in growth and neurotrophic factor gene expression in murine embryos [corrected]. *Reprod Toxicol Elmsford N*. 2000;14(1):1-11. doi: 10.1016/s0890-6238(99)00064-7.
40. Shi XY, Wang JW, Cui H, et al. Effects of antiepileptic drugs on mRNA levels of BDNF and NT-3 and cell neogenesis in the developing rat brain. *Brain Dev*. 2010;32(3):229-235. doi: 10.1016/j.braindev.2009.03.012.



Микроциркуляция крови в условиях трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии у крыс

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

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация

Цель исследования. Изучение особенностей микроциркуляции крови в мозге и сердце крыс с алкогольной кардиомиопатией (АКМП).

Материалы и методы. Исследование проводили на белых беспородных крысах самцах. Животных радомизировали на 2 группы: 1-я ($n = 7$) — контрольные (интактные) крысы, получавшие обычный рацион питания и свободный доступ к воде; 2-я ($n = 6$) — животные, получавшие обычный рацион питания и в качестве единственного источника жидкости 10 % раствор этанола. Через 24 недели алкогольизации у животных с помощью эхокардиографии оценивали размеры и инотропную функцию сердца. На следующий день у наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг в/б) с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАЗМА-Д» (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 3.0.2.396 регистрировали микроциркуляцию крови в сердце и мозге. Используя спектральный вейвлет анализ, проводили определение амплитуд эндотелиальных, нейрогенных, миогенных, пульсовых и дыхательных осцилляций микрокровотока и показателя шунтирования.

Результаты. Согласно данным эхокардиографии, у крыс, потреблявших 10 % раствор этанола в течение 24 недель, формируется АКМП, которая сопровождается снижением микроциркуляции крови в мозге и миокарде. Так, если у контрольных животных показатель микроциркуляции крови в миокарде составлял $36,60 \pm 2,19$ перф. ед., то у крыс с АКМП он был равен $26,88 \pm 1,50$ перф. ед. ($p = 0,004$). В миокарде крыс с АКМП, по сравнению с контрольными животными, амплитуда как активных, так и пассивных осцилляций микрокровотока была значимо больше.

Заключение. У крыс с АКМП в сердечной мышце значительно снижен уровень микроциркуляции крови, что согласно результатам спектрального вейвлет анализа носит прогностически неблагоприятный характер.

Ключевые слова: крысы; алкогольная кардиомиопатия; эхокардиография; микроциркуляция крови; сердце; мозг

Для цитирования:

Крыжановский С. А., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Симоненко С. А., Вититнова М. Б. Микроциркуляция крови в условиях трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии у крыс. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2024;(2):43–49. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-43-49>. EDN: IBUXEF

Поступила: 28.05.2024. В доработанном виде: 09.06.2024. Принята к печати: 17.06.2024. Опубликована: 30.06.2024.

Blood microcirculation under conditions of a translational model of alcohol cardiomyopathy in rats

© Sergey A. Kryzhanovskii, Iosif B. Tsorin, Ekaterina O. Ionova, Sophia A. Simonenko, Marina B. Vititnova

Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract

Purpose of the study. Studying the blood microcirculation characteristics in the brain and heart of rats with ACM.

Materials and methods. The study was carried out on white outbred male rats. The animals were randomized into 2 groups: 1st ($n = 7$) — control (intact) rats that received a normal diet and free access to water; 2nd ($n = 6$) — animals that received a normal diet and a 10 % ethanol solution as the only source of liquid. After 24 weeks of alcoholization in animals, the size and inotropic function of the heart were assessed using echocardiography. The next day, in anesthetized rats (urethane 1300 mg/kg i.p.), blood microcirculation in the heart and brain was recorded using a computerized laser analyzer "LAZMA-D" (manufactured by NPP "Lazma", Russia) using the LDF 3.0.2.396 program. Using spectral wavelet analysis, the amplitudes of endothelial, neurogenic, myogenic, pulse and respiratory oscillations of microblood flow and the shunting index were determined.

Results. According to echocardiography data, in rats that consumed a 10 % ethanol solution for 24 weeks, ACM is formed, which is accompanied by a decrease in blood microcirculation in the brain and myocardium. Thus, if in control animals the indicator of blood microcirculation in the myocardium was 36.60 ± 2.19 perf. u., then in rats with ACM it was equal to 26.88 ± 1.50 perf. u. units ($p = 0.004$). In the myocardium of rats with ACM, compared with control animals, the amplitude of both active and passive oscillations of microblood flow was significantly greater.

Conclusion. In rats with ACM, the level of blood microcirculation in the heart muscle is significantly reduced, which, according to the results of spectral wavelet analysis, is prognostically unfavorable.

Keywords: rats; alcoholic cardiomyopathy; echocardiography; blood microcirculation; heart; brain

For citations:

Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Ionova EO, Simonenko SA, Vititnova MB. Blood microcirculation under conditions of a translational model of alcohol cardiomyopathy in rats. Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics. 2024;(2):43–49. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-43-49>. EDN: IBUXEF

Received: 28.05.2024. Revision received: 09.06.2024. Accepted: 17.06.2024. Published: 30.06.2024.

Введение / Introduction

Длительное токсическое воздействие этанола и его метаболитов на организм, сопутствующее хроническому алкоголизму, в частности угнетает энергетический метаболизм в кардиомиоцитах, что ведёт к дистрофическим и некробиотическим процессам в миокарде и лежит в основе развития алкогольной кардиомиопатии (АКМП). Известно, что АКМП является основной причиной летальности (50–60 % всех случаев) больных, страдающих хроническим алкоголизмом [1, 2].

На разработанной нами трансляционной модели АКМП у крыс, которая воспроизводит основные клинико-диагностические признаки этого заболевания [3], было показано, что в микрососудах миокарда наблюдается стаз эритроцитов [3]. Это наблюдение хорошо корреспондирует с аутопсий хронических алкоголиков, из которых следует, что у них, независимо от наличия/отсутствия АКМП, диагностируется поражение стенки мелких сосудов: воспаление, отёк, периваскулярный фиброз, нарушения проницаемости сосудистой стенки, очаговые разрывы интимы с формированием субэндотелиальных PAS-положительных соединений (скопление позитивных макрофагов с включениями, похожими на продукты распада бактерий) в виде «выростов» полукруглой формы, обращённых в просвет сосудов, эритроцитарные стазы с явлениями сладка в капиллярах [4–7], что свидетельствует о существенном цитотоксическом влиянии алкоголя на сосудистую стенку. Однако в литературе отсутствуют данные о прижизненных особенностях микроциркуляции крови при АКМП, в том числе в таких жизненно важных органах, как мозг и сердце. Вместе с тем такая информации представляется достаточно важной, поскольку позволит судить как об особенностях патогенеза АКМП, так и о возможных точках приложения патогенетической терапии этого заболевания.

Микроциркуляция является жизненно важной системой, играющей ключевую роль в обеспечении нормальной функциональной активности органов и тканей организма. Полагают, что микроциркуляторное русло является самым важным отделом сердечно-сосудистой системы, поскольку находится в непосредственном контакте с паренхиматозными клетками, которые «полагаются» на его надлежащее функционирование для поддержания своей жизнеспособности и, следовательно, функции органа [8]. Система работает как сложная сеть взаимосвязанных микрососудов, основной функцией которых является обеспечение адекватной доставки кислорода (DO_2) к тканям в соответствии с их региональной потребностью (VO_2). Однако достижение соответствия между DO_2/VO_2 возможно только в том случае, если элементы как регионального, так и системного микрокровотока не повреждены [9]. Нарушения микроциркуляции

крови играют важную роль в формировании патологии сердечно-сосудистой системы. В частности показано, что структурные и функциональные изменения в коронарной микроциркуляции могут способствовать развитию хронической сердечной недостаточности [10]. Известно, что развитие хронической сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HFpEF) в основном обусловлено нарушением микроциркуляции в миокарде, а при хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFrEF) нейрогуморальные воздействия, влияющие на периферическую (микроциркуляторную) сосудистую сеть, были идентифицированы как важные факторы, способствующие прогрессированию заболевания и приводящие к патологическому ремоделированию левого желудочка сердца [10].

Цель исследования / Purpose of the study. Изучение микроциркуляции крови в мозге и сердце крыс с АКМП.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. 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». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Животных содержали индивидуально, в стандартных пластиковых клетках (440 × 276 × 160 мм), с предоставлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме (light off at 08-00 a.m.). 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 ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (протокол №1 от 27 сентября 2016 г.). Эксперименты разрешены биоэтической комиссией (протокол №3 28 января 2022 г.).

Экспериментальный протокол. Животных randomизировали на две группы: 1-я ($n = 7$) — контрольные

(интактные) крысы, получавшие обычный рацион питания и свободный доступ к воде; 2-я ($n = 6$) — животные, получавшие обычный рацион питания и в качестве единственного источника жидкости 10 % растворов этанола. На протяжении всего исследования еженедельно регистрировали количество потребляемого спирта (г/кг). Все отобранные животные 2-й группы активно потребляли физиологически значимое количество 10 % раствора этанола. В пересчёте на чистый этиловый спирт среднее потребление алкоголя в течение эксперимента варьировало в пределах 5,0–6,5 г/кг в сутки. Через 24 недели постоянного потребления этанола, в соответствие с полученными нами ранее данными, у крыс формируется АКМП [3].

Эхокардиографические исследования. Эхокардиографическое изучение размеров и инотропной функции сердца проводили, как описано ранее [3].

Метод измерения микроциркуляции. Эксперименты проводили на наркотизированных крысах (уретан 1300 мг/кг в/б) по окончании 24-недельной алкоголизации, через день после эхокардиографического подтверждения наличия АКМП. Оценку микроциркуляции крови в мозге и сердце крыс проводили методом лазерной допплеровской флюметрии (ЛДФ) с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАЗМА-Д» (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 3.0.2.396. Животных фиксировали на подогреваемом лабораторном столике ($t = 38^{\circ}\text{C}$) Surgi Suite, Kent Scientific Corporation, США. Температуру в лабораторной комнате поддерживали в пределах 24–25 °C. Для измерения микроциркуляции в коре головного мозга проводили трепанацию в теменной области. Измерения в сердце проводили в условиях открытой грудной клетки и искусственного дыхания с помощью аппарата искусственной вентиляции лёгких для грызунов (Ugo Basile, Италия). Световодный зонд фиксировали на поверхности органа. Длительность записи показателей микроциркуляции в каждой точке составляла 8 минут. При оценке микрокровотока рассчитывался показатель микроциркуляции (М) в перфузионных единицах (перф. ед.). Далее с помощью спектрального вейвлет анализа проводили определение активных: амплитуд эндотелиальных (A_e), нейрогенных (A_n), миогенных (A_m) и пассивных: пульсовых (A_p) и дыхательных (A_d) осцилляций микрокровотока, а также показателя шунтирования (ПШ). Такой подход даёт возможность судить о роли различных механизмов регуляции микрокровотока [11, 12].

Статистический анализ. Нормальность распределения данных проверяли по критерию Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий по Левену. Так как результаты измерений размеров, инотропной функции сердца и микроциркуляции крови распределены по нормальному закону, то для определения значимости различий использовали t -критерий Стьюдента. В случае негомогенности дисперсии применяли приближение

t -критерия для выборок с неравными дисперсиями. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Распределение результатов частотного анализа механизмов регуляции микроциркуляции значительно отличалось от нормального, в связи с этим для их статистической обработки применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Полученные результаты представляли в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Препараты. Спирт этиловый 96 %, разбавленный водопроводной водой до 10 % (ООО «Главспирт», Россия), кетамин (субстанция, ЗАО «Акрихин», Россия), уретан (субстанция, Sigma-Aldrich).

Результаты и их обсуждение / Results and discussion

Эхокардиография. Как следует из результатов эхокардиографии у крыс, которые в течение 24 недель подвергались принудительной алкоголизации, формируются характерные для АКМП изменения геометрии и инотропной функции левого желудочка сердца. Так, если у контрольных животных конечно-sistолический и конечно-диастолический размеры составляли соответственно $2,00 \pm 0,03$ мм и $3,98 \pm 0,08$ мм, то у крыс с АКМП эти показатели были статистически значимо больше — $3,43 \pm 0,1$ мм ($p < 0,001$) и $5,21 \pm 0,13$ мм ($p < 0,001$), соответственно. У крыс с АКМП, наряду с формированием алкоголь-обусловленного ремоделирования ЛЖ, наблюдается значительное угнетение инотропной функции сердца. Так, если у контрольных животных фракции укорочения и выброса были равны $49,7 \pm 0,5$ % и $86,3 \pm 0,3$ %, соответственно, то у алкоголизированных крыс эти показатели составляли соответственно $34,3 \pm 0,6$ % ($p < 0,001$) и $69,8 \pm 0,9$ % ($p < 0,001$).

Таким образом, результаты этой серии экспериментов свидетельствуют о том, что у крыс, потреблявших в течение 24 недель в качестве единственного источника жидкости 10 % растворов этанола, при помощи эхокардиографии диагностирована дилатация ЛЖ сердца и снижение его инотропной функции, что позволяет нам говорить о формировании у этих животных АКМП. Такое утверждение основывается на том, что при разработке трансляционной модели этой патологии было показано, что параллельно с формированием эхокардиографических признаков, патогномоничных для АКМП, развивается жировая дистрофия миокарда, снижается электрическая стабильность кардиомиоцитов и др. [3], что соответствует известным клинико-диагностическим признакам, характерным для этой патологии.

Микроциркуляция. Анализ результатов, полученных при оценке интенсивности микроциркуляции крови в теменной области мозга крыс, показал, что у животных со сформировавшейся АКМП, по сравнению кон-

трольными крысами, уровень микроциркуляции крови несколько (\approx на 10 %), но статистически значимо, снижен (табл. 1). Так, если у контрольных животных уровень микроциркуляции крови равнялся $29,79 \pm 0,62$ перф. ед., то у крыс со сформировавшейся АКМП он составлял $26,89 \pm 0,83$ перф. ед. ($p = 0,015$). В миокарде крыс со сформировавшейся АКМП происходит более существенное, по сравнению с мозгом, снижение (\approx на 27 %) уровня микроциркуляции крови (табл. 1). Так, если у контрольных животных уровень микроциркуляции крови в миокарде составлял $36,60 \pm 2,19$ перф. ед., то у крыс с АКМП этот показатель был равен $26,88 \pm 1,50$ перф. ед. ($p = 0,004$).

Таблица 1

Изменения микроциркуляции крови (перф. ед.) в мозге и сердце в условиях трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии у крыс

Table 1

Changes in blood microcirculation (perf. units) in the brain and heart under the conditions of a translational model of alcoholic cardiomyopathy in rats

Группа	Мозг	Сердце
Контроль, $n = 7$	$29,79 \pm 0,62$	$36,60 \pm 2,19$
АКМП, $n = 6$	$26,89 \pm 0,83$	$26,88 \pm 1,50$
p	0,015	0,004

Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; p указано по отношению к контролю; наркоз уретан, 1300 мг/кг в/б.

Notes: Arithmetic averages and their standard errors are shown; p is indicated in relation to the control; anesthesia urethane, 1300 mg/kg i.p.

Таким образом, нами впервые показано, что у крыс со сформировавшейся АКМП происходит снижение уровня микроциркуляции крови в таких жизненно важных органах, как мозг и сердце. Эти наблюдения имеют важное значение, поскольку свидетельствуют о том, что у крыс в условиях АКМП происходит нарушение не только системной, но и внутриорганной гемодинамики, что прогностически крайне неблагоприятно.

Амплитуды (перф. ед.) эндотелиальных (A_e), нейрогенных (A_n), миогенных (A_m), дыхательных (A_d) и пульсовых (A_k) осцилляций микрокровотока и показатель шунтирования (ПШ) у крыс со сформировавшейся АКМП по сравнению с контрольными животными

Table 2

Amplitudes (perf. units) of endothelial (A_e), neurogenic (A_n), myogenic (A_m), respiratory (A_d) and pulse (A_k) oscillations of microblood flow and the shunt index (PS) in rats with formed ACM compared with control animals

Орган	Группа	n	Аэ	Ан	Ам	Ад	Ак	ПШ
Мозг	Контроль	9	$0,14$ $0,13 \div 0,16$	$0,13$ $0,11 \div 0,14$	$0,14$ $0,13 \div 0,15$	$0,20$ $0,20 \div 0,22$	$0,37$ $0,32 \div 0,40$	$0,82$ $0,77 \div 0,93$
	АКМП	6	$0,20$ $0,18 \div 0,24$	$0,17$ $0,11 \div 0,21$	$0,15$ $0,13 \div 0,19$	$0,19$ $0,19 \div 0,20$	$0,31$ $0,29 \div 0,36$	$0,95$ $0,85 \div 1,16$
Сердце	Контроль	10	$0,21$ $0,16 \div$	$0,27$ $0,22 \div 0,35$	$0,42$ $0,30 \div 0,45$	$0,68$ $0,38 \div 0,77$	$1,68$ $1,15 \div 2,60$	$0,69$ $0,55 \div 1,03$
	АКМП	6	$0,62^*$ $0,54 \div 0,71$	$0,75^{**}$ $0,64 \div 0,90$	$1,19^{**}$ $0,74 \div 1,89$	$1,65^*$ $0,74 \div 3,02$	$5,96^{**}$ $4,54 \div 7,20$	$0,65$ $0,44 \div 0,86$

Примечания: Показаны медианы и нижний и верхний квартили; * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$ по отношению к контролю.

Notes: The medians and the lower and upper quartiles are shown; * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$ relative to the control.

ми более высокими адаптационными возможностями системы, ответственной за ауторегуляцию мозгового кровотока [18].

В миокарде наблюдается принципиально другая картина. У животных со сформировавшейся АКМП статистически значимо увеличивается амплитуда всех активных (A_s , A_h , A_m) и пассивных (A_d и A_k) осцилляций микрокровотока, однако при этом ПШ не изменяется (табл. 2). Увеличение амплитуды эндотелиальных осцилляций (A_s) указывает на рост метаболической активности эндотелия коронарных сосудов и увеличение уровня секреции оксида азота, что вызывает дилатацию артерий и крупных артериол. Повышение амплитуды нейрогенных осцилляций (A_h) указывает на усиление активного контроля микрокровотока за счёт симпатической регуляции просвета артериол и артериоло-венулярных анастомозов. Увеличение миогенных осцилляций (A_m) свидетельствует об усилении активности прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метаартериол. Параллельно с этим происходит как возрастание амплитуды дыхательных осцилляций, что свидетельствует о нарушении венозного оттока, так и увеличение амплитуды пульсовых осцилляций микрокровотока (A_k), что, по всей видимости, свидетельствует о росте колебаний перфузионного давления в микрососудах миокарда [11, 12].

Результаты спектрального вейвлет анализа, а именно, увеличение амплитуд активных осцилляций

микрокровотока свидетельствует об активации процессов, направленных на поддержание адекватного кровоснабжения в миокарде.

Однако компенсаторные процессы «наталкиваются на противодействие» со стороны венозного звена микроциркуляторного русла, о чём свидетельствует рост амплитуды пассивных осцилляций, что влечёт за собой нарушение оттока крови и, следовательно, накопление в миокарде токсических продуктов метаболизма алкоголя. Помимо этого, увеличение амплитуды пульсовых осцилляций микрокровотока (A_k) может свидетельствовать об увеличении регидности магистральных сосудов, т. е. формировании системной патологии сосудистого русла [15].

Таким образом, у крыс в условиях трансляционной модели АКМП наблюдаются как патологическое ре-моделирование левого желудочка сердца и снижение его инотропной функции, что позволяет говорить о нарушении в системе макроциркуляции крови, так и значительное снижение уровня микроциркуляции крови в миокарде, сопровождающееся формированием венозного застоя, т. е. нарушением внутриорганной гемодинамики, что прогностически крайне неблагоприятно. Выявленные нарушения внутриорганной гемодинамики у крыс с АКМП могут быть связаны не только со снижением насосной функции сердца, но и системной патологией сосудистого русла.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Funding

The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Крыжановский Сергей Александрович

Автор, ответственный за переписку

д. м. н., зав. лабораторией фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
e-mail: kryzhanovskij_sa@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
РИНЦ SPIN-код: 6596-4865

Sergey A. Kryzhanovskii

Corresponding author

PhD, Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: kryzhanovskij_sa@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
RSCI SPIN code: 6596-4865

Цорин Иосиф Борисович

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
РИНЦ SPIN-код: 4015-3025

Iosif B. Tsorin

PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Moscow,
Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
RSCI SPIN code: 4015-3025

Ионова Екатерина Олеговна

к. м. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>
РИНЦ SPIN-код: 5042-1952

Ekaterina O. Ionova

PhD, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Moscow,
Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>
RSCI SPIN code: 5042-1952

Симоненко София Алексеевна

лаборант-исследователь лаборатории
фармакологии кровообращения ФГБНУ
«ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация
РИНЦ SPIN-код: 3075-6496

Sophia A. Simonenko

laboratory research assistant of laboratory of cir-
culation pharmacology Federal research center for
innovator and emerging biomedical and pharma-
ceutical technologies, Moscow, Russian Federation
RSCI SPIN code: 3075-6496

Вититнова Марина Борисовна

к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии
кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
РИНЦ SPIN-код: 1901-8919

Marina B. Vititnova

PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of
Laboratory of Circulation Pharmacology Federal
research center for innovator and emerging bio-
medical and pharmaceutical technologies, Moscow,
Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
RSCI SPIN code: 1901-8919

Список литературы / References

1. Бохан Н.А., Мандель А.И., Максименко Н.Н., Михалева Л.Д. Смертельные исходы при алкогольной зависимости. *Наркология*. 2007;12:37-40. [Bohan NA, Mandel AI, Maximenko NN, Mihaleva LD. Lethal outcomes in alcoholism. *Narcology*. 2007;12:37-40. (In Russ.)].
2. Алкогольная болезнь. Поражение внутренних органов : монография / [Моисеев В. С., и др.] ; под ред. В. С. Моисеева. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 469 с. [Alcoholic disease. Lesions of internal organs. Moiseev VS, et al; Ed by Moiseev VS. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. (In Russ.)]. ISBN: 978-5-9704-2812-2.
3. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б., и др. Алкогольная кардиомиопатия: трансляционная модель. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017;163(5):582-586. [Kryzhanovskii SA, Kolik LG, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Ionova EO, Sorokina AV, Durnev AD. Alcoholic cardiomyopathy: Translation model. *Bull Exp Biol Med*. 2017;163(5):627-631. doi: 10.1007/s10517-017-3865-0.
4. Соколова О.В. Морфологические изменения ткани миокарда при внезапной сердечной смерти от алкогольной кардиомиопатии. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2016;59(1):3-6. [Sokolova OV. The morphological changes in the myocardial tissue after sudden cardiac death from alcoholic cardiomyopathy. *Forensic Medical Expertise*. 2016;59(1):3-6. (In Russ.)]. doi: 10.17116/sudmed20165913-6.
5. Соколова О.В., Ягмурев О.Д., Насыров Р.А. Судебно медицинская оценка изменений сосудистого русла ткани миокарда в случаях внезапной сердечной смерти от алкогольной кардиомиопатии. *Вестник судебной медицины*. 2018;7(3):32-35. [Sokolova OV, Yagmurov OD, Nasyrov RA. Forensic medical assessment of changes in the vascular bed of myocardial tissue in cases of the sudden cardiac death from alcoholic cardiomyopathy. *Bulletin of Forensic Medicine*. 2018;7(3):32-35. (In Russ.)].
6. Doggett TM, Breslin JW. Acute alcohol intoxication-induced microvascular leakage. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014 Sep;38(9):2414-26. doi: 10.1111/acer.12525.
7. Jalali Z, Khademhosseini M, Soltani N, Esmaeili Nadimi A. Smoking, alcohol and opioids effect on coronary microcirculation: an update overview. *BMC Cardiovasc Disord*. 2021 Apr 15;21(1):185. doi: 10.1186/s12872-021-01990-y.
8. Guven G, Hilty MP, Ince C. Microcirculation: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Application. *Blood Purif*. 2020;49(1-2):143-150. doi: 10.1159/000503775.
9. Slovinski AP, Hajjar LA, Ince C. Microcirculation in Cardiovascular Diseases. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2019 Dec;33(12):3458-3468. doi: 10.1053/j.jvca.2019.08.008.

10. Milićić D, Jakuš N, Fabijanović D. Microcirculation and Heart Failure. *Curr Pharm Des.* 2018;24(25):2954-2959. doi: 10.2174/1381612824666180625143232.
11. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем : колебания, информация, нелинейность : руководство для врачей / А. И. Крупинкин, В. В. Сидоров. — Москва : Книжный дом «Либроком», 2014. — 489 с. [Functional diagnostics of the state of microcirculatory-tissue systems, Vibrations, information, nonlinearity. Krupatkin AI, Sidorov VV. Moscow: Book house "Librocom". 2014. (In Russ.).] ISBN: 978-5-397-04451-6
12. Сидоров В.В., Рыбаков Ю.Л., Гукасов В.М. Диагностический подход для оценки состояния микроциркуляторно-тканевой системы с использованием лазерных технологий и температурной функциональной пробы. *Иноватика и экспертиза.* 2018; Вып. 1(22):135-142. [Sidorov VV, Rybakov YuL, Gukasov VM. Diagnostic approach for estimation of the state of microcirculator-tissue system using laser technologies and temperature functional sample. *Innovation and expertise.* 2018; Issue 1(22): 135-142. (In Russ.).]
13. Safar ME, Rizzoni D, Blacher J, et al. Macro and microvasculature in hypertension: therapeutic aspects. *J Hum Hypertens.* 2008 Sep;22(9):590-5. doi: 10.1038/jhh.2008.43.
14. Martinez-Lemus LA, Galíñanes EL. Matrix metalloproteinases and small artery remodeling. *Drug Discov Today Dis Models.* 2011 Spring;8(1):21-28. doi: 10.1016/j.ddmod.2011.06.002.
15. Laurent S, Agabiti-Rosei C, Bruno RM, Rizzoni D. Microcirculation and Macrocirculation in Hypertension: A Dangerous Cross-Link? *Hypertension.* 2022 Mar;79(3):479-490. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17962.
16. Chantler PD, Frisbee JC. Arterial function in cardio-metabolic diseases: from the microcirculation to the large conduits. *Prog Cardiovasc Dis.* 2015 Mar-Apr;57(5):489-96. doi: 10.1016/j.pcad.2014.09.005.
17. Rizzoni D, Rizzoni M, Nardin M, Chiarini G, Agabiti-Rosei C, Aggiusti C, Paini A, Salvetti M, Muiyesan ML. Vascular Aging and Disease of the Small Vessels. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2019 Jun;26(3):183-189. doi: 10.1007/s40292-019-00320-w.
18. Кровообращение / Б. Фолков, Э. Нил ; Пер. с англ. Н. М. Верич. Москва: Медицина, 1976. 464 с. [Blood circulation. Folkov B, Neil E; Translated from the English by NM Verich. Moscow: Medicine, 1976. (In Russ.).]



Экспериментальная модель расстройств аутистического спектра, вызванная пренатальным введением пропионовой кислоты крысам Вистар

© Бояркин В. С., Капица И. Г., Воронина Т. А.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Расстройства аутистического спектра (PAC) — нарушение развития мозга с неясной этиологией и патофизиологией, характеризующееся нарушением социального общения, стереотипным или повторяющимся поведением и умственной отсталостью разной степени. Одним из факторов окружающей среды, оказывающих неблагоприятное влияние на беременных женщин и на развитие эмбриона, является пропионовая кислота (ППК), которая является вторичным метаболитом кишечной микробиоты и широко используется в качестве пищевого консерванта. В физиологических условиях ППК модулирует клеточную передачу сигнала, синтез и высвобождение нейротрансмиттеров, клеточное взаимодействие, экспрессию генов, иммунную функцию, влияет на митохондриальный и липидный метаболизм. Чрезмерное воздействие ППК может оказывать ряд негативных последствий на здоровье и поведение, в том числе приводить к развитию PAC.

Целью настоящей работы была оценка поведенческих особенностей у самцов и самок крыс Вистар с PAC, вызванным пренатальным введением натриевой соли пропионовой кислоты, на стадии раннего перинатального и ювенильного периода развития.

Методы. В условиях модели PAC, индуцированной пренатальным введением пропионовой кислоты в дозе 500 мг/кг, п/к на 12–16 дни гестации, проведена оценка поведения в «гнездовой» и ювенильный периоды жизни самцов и самок крыс Вистар. Оценивали физическое и неврологическое развитие, социальное поведение («Материнский запах», «Парный тест»), повторяющееся поведение (Y-лабиринт, «Автогруминг»), двигательную и исследовательскую активность («Норковый тест»).

Результаты. У крыс Вистар, пренатально получавших пропионовую кислоту, отмечалось замедление формирования ряда рефлексов на стадии раннего постнатального развития, а в более поздние сроки — снижение социального поведения, усиление стереотипии и агрессии, гиперлокомоция и низкая исследовательская активность.

Заключение. Модель PAC, индуцированная пренатальным введением ППК, является адекватной и пригодной для изучения средств фармакологической коррекции PAC.

Ключевые слова: расстройство аутистического спектра; пренатальное введение пропионовой кислоты; крысы; ранний перинатальный «гнездовой» период; ювенильный период; поведение

Для цитирования:

Бояркин В. С., Капица И. Г., Воронина Т. А. Экспериментальная модель расстройств аутистического спектра, вызванная пренатальным введением пропионовой кислоты крысам Вистар. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2024;2):50–56. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-50-56>. EDN: YJKWFL

Поступила: 06.05.2024. В доработанном виде: 22.05.2024. Принята к печати: 27.06.2024. Опубликована: 30.06.2024.

Experimental model of autism spectrum disorder induced by prenatal administration of propionic acid to Wistar rats

© Valentin S. Boyarkin, Inga G. Kapitsa, Tatiana A. Voronina

Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract

Relevance. Autism spectrum disorder (ASD) is a developmental disorder of the brain with unclear etiology and pathophysiology, characterized by impaired social communication, stereotypic or repetitive behavior, and varying degrees of mental retardation. One of the environmental factors that have an adverse effect on pregnant women and embryo development is propionic acid (PPA), which is a secondary metabolite of the intestinal microbiota and is widely used as a food preservative. Under physiological conditions, PPC modulates cellular signal transduction, neurotransmitter synthesis and release, cellular interactions, gene expression, immune function, and affects mitochondrial and lipid metabolism. Excessive exposure to PPC can have a number of negative consequences on health and behavior, including leading to the development of ASD.

The aim of present research was to assess behavioral characteristics in male and female Wistar rats with ASD caused by prenatal administration of sodium salt of propionic acid at the early perinatal and juvenile stages of development.

Methods. In a model of ASD induced by prenatal administration of propionic acid at a dose of 500 mg/kg, subcutaneously on days 12–16 of gestation, behavior was assessed in the “nesting” and juvenile periods of life in male and female Wistar rats. Physical and neurological development, social behavior (“Maternal scent”, “Paired test”), repetitive behavior (Y-maze, “Auto-grooming”), motor and exploratory activity (“Mink test”) were assessed.

Results. In Wistar rats prenatally treated with propionic acid, there was a slowdown in the formation of a number of reflexes at the stage of early postnatal development, and at a later stage – a decrease in social behavior, increased stereotypy and aggression, hyperlocomotion and low exploratory activity.

Conclusion. The ASD model induced by prenatal administration of PPC is adequate and suitable for studying means of pharmacological correction of ASD.

Keywords: autism spectrum disorder; prenatal administration of propionic acid; rats; early perinatal nesting period; juvenile period; behavior

For citations:

Boyarkin VS, Kapitsa IG, Voronina TA. Experimental model of autism spectrum disorder induced by prenatal administration of propionic acid to Wistar rats. Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics. 2024;(2):50-56. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-50-56>. EDN: YJKWFL

Received: 06.05.2024. **Revision received:** 22.05.2024. **Accepted:** 27.06.2024. **Published:** 30.06.2024.

Введение / Introduction

Расстройства аутистического спектра (PAC) — нарушение развития мозга с неясной этиологией и патофизиологией, характеризующееся, наряду с нарушением социального поведения и коммуникации, стереотипным или повторяющимся поведением, сенсорными изменениями и умственной отсталостью разной степени, также чрезмерной пролиферацией глии, митохондриальной дисфункцией, окислительным стрессом, нейровоспалением, аномальным формированием синапсов, нарушением синтеза и оборота нейромедиаторов, дисфункцией кишечника и желудочно-кишечными расстройствами [1]. Считается, что PAC является результатом взаимодействия генетической предрасположенности, неблагоприятных воздействий окружающей среды и нарушений иммунной системы матери в ранний период беременности [2]. Факторы окружающей среды могут влиять на генетические процессы развития мозга посредством модуляции молекулярных путей, которые могут быть связаны с PAC. Вальпроевая кислота и пропионовая кислота (ППК) являются одними из ряда факторов окружающей среды, которые могут оказывать неблагоприятное воздействие на беременных женщин и изменять закономерности развития эмбриона. ППК является вторичным метаболитом кишечной микробиоты, который обычно используется в качестве пищевого консерванта. ППК играет значительную роль в возникновении PAC, изменяя несколько молекулярных путей развития, таких как PTEN/Akt, mTOR/Gsk β , пути, активируемые цитокинами и т. д., на пренатальном и неонатальном этапе [3].

Важной особенностью PAC является его выраженная коморбидность (от 9 % до 90 %) с желудочно-кишечными симптомами, такими как запор, боль в животе, диарея, газы и рвота, тесно коррелирующие с тяжестью PAC [4], что свидетельствует о важной роли кишечника в патогенезе PAC [5]. Исследования состава микробиоты у пациентов с PAC по сравнению с нейротипичными сверстниками, обнаружили повышенный уровень кишечных микроорганизмов, таких как *Clostridia* spp., *Bacterioidetes* и *Desulfovibrio* spp., являющихся активными ферментаторами пищевых углеводов и волокон, вызывающих избыточное образование побочных продуктов энергетического обмена: ацетата, бутират и в большей степени ППК [6]. Также у пациентов с PAC отмечается повышенная проницаемость кишечника, так называемая «дырявая кишечка», что позволяет бактериальным метаболитам легко преодолевать кишечный барьер, проникая в кровяное русло. ППК легко проходит через ГЭБ, мо-

дулируя в норме многочисленные клеточные сигнальные процессы, включая энергетический метаболизм, синтез и высвобождение нейромедиаторов и липидный метаболизм [7]. Чрезмерный уровень ППК токсичен, а при PAC его содержание в крови и кале превышает норму [8]. Повышенный уровень ППК вызывает систематическую митохондриальную дисфункцию, о чём свидетельствует увеличение количества свободного ацилкарнитина и нарушение метаболизма жирных кислот, показанные у крыс в эксперименте, и более чем у 30 % пациентов с PAC [2]. Показано, что изменение микробиома в кишечнике матери во время беременности (повышенное потребление обработанных пищевых продуктов, богатых ППК, в сочетании с уже существующим дисбактериозом) может привести к накоплению ППК в ЖКТ, способной проходить через плацентарный барьер и усиливать пролиферацию, выживание глиальных клеток-предшественников и воспалительный профиль, вызывая нарушение формирования нейронных структур на ранних стадиях развития плода [9].

Для моделирования PAC в настоящее время чаще применяют постнатальное введение ППК крысам в возрасте от 6 дней до 2,5–3 месяцев, которое осуществляется интрацеребровентрикулярно [10], а также подкожно, внутрибрюшинно и перорально [7, 11, 12]. Реже моделирование PAC проводят при пренатальном воздействии ППК на 16–21 дни гестации самкам крыс [2], что соответствует концу 1 триместра — стадии закрытия нервной трубы, и 2 триместру беременности человека. Пренатальное введение ППК имитирует пропионовую ацидемию, при которой наблюдается нарушение обмена веществ и схожие с PAC клинические проявления [13]. Однако спектр поведенческих нарушений, возникающих при моделировании PAC у крыс с использованием пренатального введения ППК, изучен недостаточно. Кроме того, данных о гендерных особенностях PAC у крысят на модели с пренатальным введением ППК, недостаточно.

Целью работы явилась оценка поведенческих нарушений у самцов и самок крыс линии Вистар на стадиях раннего перинатального и ювенильного периода развития, наблюдавшихся при моделировании расстройств аутистического спектра пренатальным введением натриевой соли пропионовой кислоты.

Материал и методы / Materials and methods

Исследование проведено на крысах линии Вистар, родительское поколение которых было получено из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр

биомедицинских технологий ФМБА России». Крыс содержали в стандартных условиях вивария ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» в соответствии с ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» при регулируемом световом режиме 12 ч/12 ч (свет/темнота) и постоянной температуре (21–23 °С) со свободным доступом к воде и гранулированному корму в полипропиленовых клетках с решёткой из цинкохромовой стали, с обеспыленной подстилкой из деревянной стружки. Проведение экспериментов осуществлялось согласно Приложению «Руководство по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» (ПРИЛОЖЕНИЕ к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 года № 33) и было одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» (протокол № 1 от 18.01.2023 г.). Животных для исследования получали от половозрелых виргинных самок крыс линии Вистар с контролируемыми циклами фертильности, которых спаривали в течение ночи, а утром брали влагалищный мазок, и при обнаружении сперматозоидов в нём, определяли его как “0” день (E0) развития плода. Беременных самок содержали по 4–5 особей в одной клетке до 17–18 дня гестации, после чего размещали в индивидуальные клетки.

Моделирование PAC проводили путём введения ППК (P1880, Sigma-Aldrich Company) растворённого в 0,1 М физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) pH доводили до 7,4 концентратом соляной кислоты) вводили подкожно в дозе 500 мг/кг (250 мг/мл) на 12–16 дни гестации крыс (E12–16) [2, 14]. Для получения контрольных групп беременным самкам в те же сроки и в том же режиме вводили PBS. День появления крысят принимали за “0” сутки постnatalного развития (P0). Потомство крыс с учётом гендерной принадлежности было разделено на группы: «Контроль» и «ППК».

Тестирование крысят с PAC проводили с P6 по P48 с использованием тестов, направленных на оценку скорости развития нервной системы [2] и выраженности социального дефицита, стереотипии, агрессии, тревожности.

В качестве тестов для оценки развития крысят, в частности способности поддерживать позу, использовали тест «Переворот на плоскости» — крысёнка клади на спину и отмечали время, за которое он перевернётся на все четыре лапы. Максимальное время наблюдения составляло 30 с.

В тесте «Отползание от края» — крысёнка располагали на краю коробки с гладкой поверхностью так,

чтобы пальцы передних лап и голова свисали над её краем и отмечали время отползания от края коробки. Максимальное время наблюдения — 30 с.

Для оценки вестибулярной функции, двигательного развития, активности и целостности мозжечка использовали тест «Отрицательный геотаксис», основанный на врождённой постуральной реакции здоровых грызунов, которая появляется уже на второй неделе жизни. Крысёнка помещали на наклонённую под 45° сетку длиной 30 см в положении «головой вниз» и в течение 30 с фиксировали время поворота животного на 180° в положение «головой вверх».

Тест «Материнский запах» позволяет оценить реакцию грызуна на поиск гнезда, опосредованную обонятельной системой, которое является для них социально-значимым фактором. Крысёнка помещают в центр тестовой клетки Т/3С, сходную с «домашней», визуально поделённую на 3 равные секции, где одна из боковых секций заполняется на глубину 3 см опилками из «домашней» клетки, другая — чистыми «нейтральными» опилками, а центральная — не содержит опилок. Фиксировали продолжительность нахождения крысят в секциях клетки и число заходов в них в течение 2 минут [15]. Тестирование проводили на P21.

Влияние ППК на оперативную (рабочую) память и стереотипное поведение у крыс оценивали в teste «У-лабиринт», установка для которого представляет собой расположенные друг от друга под углом 120° три серых непрозрачных пластиковых рукава (длина, ширина и высота стенок — 40×8×15 см), (НПК «Открытая Наука», Россия). Животное помещают в центр лабиринта и регистрируют в течение 5 минут число заходов в рукава и последовательность их посещения, вычленяя триплеты — любое последовательное посещение трёх разных рукавов, двигательную активность (общее количество посещённых рукавов), а также число возвратов в предварительно посещённый рукав или только что оставленный [16].

Тест «Норковый тест» используется для оценки исследовательской деятельности и тревожности. Установка представляет собой квадратную камеру, пол которой разделён на 13 равных квадратов с 13 отверстиями диаметром 3 см. В течение 10 минут регистрировали число посещённых крысой квадратов установки, число вертикальных стоек и заглядываний в отверстия [11, 17]. Тестирование проводили на P32.

Тест «Парное взаимодействие» проводят между парами крыс из одной группы, но из разных клеток, в прямоугольной арене с непрозрачными чёрными стенками (длина, ширина, высота: 75×41×30 см) после предварительной адаптации к ней за 24 часа. В течение 10 мин оценивают коммуникативное поведение, включающее в себя подходы, обнюхивание ростральной части тела и ануса, аллогруминг, и агрессивное поведение (хватание, покусывание, преследование, оборонительная стойка, поза доминирования — на-

висание над лежащей на спине крысой) [18]. Тестирование проводилось на P33.

Стереотипное поведение крыс с РАС также оценивали в тесте «Автогруминг» на P48. Крысу помещают в центр клетки, аналогичной «домашней», пол которой разделен на 6 равных квадратов и в течение 10 минут фиксируют число вертикальных стоек и посещённых квадратов, количество и продолжительность эпизодов груминга.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью пакета программ GraphPad Prism v.8.4.3. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Достоверность различий рассчитывали, используя непараметрический анализ для независимых переменных U-тест Манна–Уитни. Результаты представлены как среднее \pm ошибка среднего (Mean \pm SEM). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты / Results

Введение ППК вызывало снижение скорости формирования постурального, вестибулярного и сенсорно-двигательного рефлексов, как у самцов, так и у самок крыс. Так, самцы и самки крыс группы «ППК» соответственно осуществляли в 1,8 и 2,2 раза дольше переворот на плоскости со спины на конечности, в 1,5 и 1,6 раз поворот на 180° по наклонной плоскости в направлении снизу вверх в тесте «Отрицательный геотаксис» в сравнении с животными групп «Контроль». Кроме того, самцы крыс группы «ППК» в 1,4 раза медленнее отползали от края по сравнению с контрольными животными (табл. 1).

У крыс, пренатально получавших ППК выявлено снижение предпочтения материнского запаха, что

выразилось в уменьшении длительности нахождения в секции с опилками их домашней клетки в 1,7 раза у самцов и в 1,8 раза у самок в сравнении с контрольными группами (табл. 2). Кроме того, самки крыс с ППК демонстрировали повышенную двигательную активность, выразившуюся в увеличении в 1,7 раза числа переходов между отсеками относительно показателей группы «Контроль».

Таблица 2

Влияние пренатального введения пропионовой кислоты на поведение крыс Вистар в тесте «Материнский запах» в гнездовом периоде (P21)

Table 2

Effect of prenatal administration of propionic acid on the behavior of Wistar rats in the “Maternal smell” test during the nesting period (P21)

Параметры	Группа, число животных			
	Самцы		Самки	
	Контроль, $n = 20$	ППК, $n = 13$	Контроль, $n = 18$	ППК, $n = 12$
Время нахождения в отсеке с опилками из домашней клетки, с	59,6 \pm 5,1	35,5 \pm 4,3*	67,3 \pm 7,0	37,9 \pm 3,8*
Число переходов, ед.	6,3 \pm 0,6	6,2 \pm 0,5	4,5 \pm 0,4	7,6 \pm 0,6*

Примечание: * — $p < 0,001$ по сравнению с группой «Контроль».
Note: * — $p < 0,001$ compared to the «Control» group.

Анализ результатов, полученных при оценке спонтанного поведения крыс с РАС и влияния на кратковременную память в тесте «У-лабиринт», не выявил отличий по числу триплетов как у самок, так и самцов по сравнению с показателями контрольных групп (данные не представлены), однако у самцов крыс с РАС показано увеличение стереотипного поведения, что выразилось в росте в 2,1 раза числа возвратов в уже посещённые рукава (табл. 3). У самцов группы «ППК» отмечалось повышение двигательной активности, выразившееся в увеличении в 1,3 раза числа визитов в рукава лабиринта по сравнению с группой «Контроль» (табл. 3). Аналогично, у самок крыс группы «ППК», двигательная активность при свободном поведении в «У-лабиринте» значительно превышала в 1,7 раза показатели группы контроль (11,7 \pm 0,8 vs 6,9 \pm 1,8).

В «Норковом тесте» выявлено снижение в 1,5 и 2,4 раз числа заглядываний в норки и в 1,5 и 1,8 раз числа вертикальных стоек, соответственно, у самцов и самок крыс с РАС относительно контрольных значений при отсутствии различий между опытными и контрольными группами по числу перемещений, что свидетельствует о снижении исследовательского поведения, и возможно связано с повышением тревожности (табл. 4).

Пренатальное введение ППК приводило к дефициту социального поведения и повышению агрессии,

Таблица 1
Влияние пренатального введения пропионовой кислоты на скорость формирования рефлекторного аппарата у крыс Вистар в гнездовой период

Table 1

The influence of prenatal administration of propionic acid on the rate of formation of the reflex apparatus in Wistar rats during the nesting period

Тест, день постнатального развития	Группа, число животных			
	Самцы		Самки	
	Контроль, $n = 33$	ППК, $n = 37$	Контроль, $n = 15$	ППК, $n = 27$
Переворот на плоскости, с, P6	3,5 \pm 0,6	6,2 \pm 1,3*	2,9 \pm 0,3	6,3 \pm 1,2*
Отползание от края, с, P11	13,4 \pm 1,7	18,2 \pm 1,5*	13,6 \pm 2,0	13,7 \pm 1,5
Отрицательный геотаксис, с, P14	6,1 \pm 0,6	9,1 \pm 1,1*	6,7 \pm 0,47	10,5 \pm 1,4*

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «Контроль».
Note: * — $p < 0,05$ compared to the «Control» group.

Таблица 3

Влияние пренатального введения пропионовой кислоты на поведение самцов крыс Вистар в teste «У-лабиринт» в ювенильный период (Р26)

Table 3

Effect of prenatal administration of propionic acid on the behavior of male Wistar rats in the Y-maze test during the juvenile period (P26)

Параметры	Группа, число животных	
	Контроль, n = 13	ППК, n = 10
Число возвратов в рукав, ед.	1,3 ± 0,4	3,0 ± 0,6*
Число переходов, ед.	9,5 ± 0,6	12,8 ± 1,3*

Примечание: * — p < 0,05 по сравнению с группой «Контроль».
Note: * — p < 0.05 compared to the «Control» group.

Таблица 4

Влияние пренатального введения пропионовой кислоты на поведение крыс Вистар в «Норковом teste» в ювенильный период (Р31)

Table 4

The effect of prenatal administration of propionic acid on the behavior of Wistar rats in the “Nose Poke test” during the juvenile period (P31)

Параметры	Группа, число животных			
	Самцы		Самки	
	Контроль, n = 14	ППК, n = 12	Контроль, n = 10	ППК, n = 12
Двигательная активность, ед.	27,4 ± 2,6	25,6 ± 2,0	27,8 ± 4,3	27,1 ± 3,5
Заглядывания в норки, с	9,6 ± 1,3	6,6 ± 0,9*	6,6 ± 1,3	2,7 ± 0,6*
Число стоек, ед.	6,9 ± 1,1	4,5 ± 0,6* (p = 0,07)	9,4 ± 1,8	5,1 ± 1,6* (p = 0,08)

Примечание: * — p < 0,05 по сравнению с группой «Контроль».
Note: * — p < 0.05 compared to the «Control» group.

как у самцов, так и у самок крыс, что выразилось в снижении числа коммуникативных актов и резком повышении числа актов, свидетельствующих об агрессивном поведении (хватание, покусывание, преследование, оборонительная стойка, доминирование) по сравнению с показателями группы «Контроль» (табл. 5).

В teste «Автогруминг» у самцов крыс с РАС отмечалась повышенная стереотипия, которая проявлялась в увеличении в 1,5 раза числа актов груминга в сравнении с данными группы «Контроль» (табл. 6).

В течение всего эксперимента проводили измерение массы тела крысят. У самцов крыс, которым пренатально вводили ППК, на протяжении первого месяца жизни прирост массы тела относительно фонового значения, регистрируемого на Р6, не отличался от показателя крыс группы «Контроль», однако с Р34 по Р46 значимо его превышал (рис. 1). У самок крыс группы «ППК» различий с контрольной группой по приросту массы тела не обнаружено (данные не представлены).

Таблица 5

Влияние пренатального введения пропионовой кислоты на поведение крыс Вистар в «Парном teste» в ювенильный период (Р33)

Table 5

The effect of prenatal administration of propionic acid on the behavior of Wistar rats in the “Paired Test” during the juvenile period (P33)

Параметры	Группа, число животных			
	Самцы		Самки	
Параметры	Контроль, n = 14	ППК, n = 20	Контроль, n = 10	ППК, n = 14
Коммуникативное поведение, ед.	23,5 ± 2,1	15,1 ± 1,1**	17,8 ± 2,9	11,3 ± 1,8**
Агрессивное поведение, ед.	2,3 ± 1,4	8,8 ± 2,2*	5,8 ± 1,8	21,3 ± 5,1*

Примечание: *, ** — p < 0,05, p < 0,001 по сравнению с группой «Контроль», соответственно.
Note: *, ** — p < 0.05, p < 0.001 compared to the “Control” group, respectively.

Таблица 6

Влияние пренатального введения пропионовой кислоты на поведение самцов крыс Вистар в teste «Автогруминг» в ювенильный период (Р48)

Table 6

The effect of prenatal administration of propionic acid on the behavior of male Wistar rats in the “Auto-grooming” test during the juvenile period (P48)

Параметры	Группа, число животных	
	Контроль, n = 10	ППК, n = 10
Число эпизодов груминга, ед.	11,7 ± 2,1	17,4 ± 1,8*

Примечание: * — p < 0,05 по сравнению с группой «Контроль».
Note: * — p < 0.05, compared to the «Control» group.

Таким образом, пренатальное введение ППК оказывает негативное воздействие на развитие и поведение потомства крыс Вистар в «гнездовой» и ювенильный периоды, что выразилось в отставании в интеграции координированных двигательных рефлексов и вестибулярной функции (больший латентный период рефлекторного переворачивания со спины на лапы, нарушение выполнения реакции в teste «Отрицательный геотаксис»), пониженной реакции поиска гнезда, вызванную ольфакторным стимулом (тест «Материнский запах»), повышением стереотипии, гиперактивности, снижением исследовательской деятельности, повышением агрессии, снижением способности к коммуникации. Выявленные нарушения на фоне пренатального введения ППК проявлялись как у самцов, так и у самок крыс Вистар.

ППК в высоких дозах обладает токсическими свойствами, вызывая у детей судороги, некоторые виды двигательных расстройств, задержку развития,

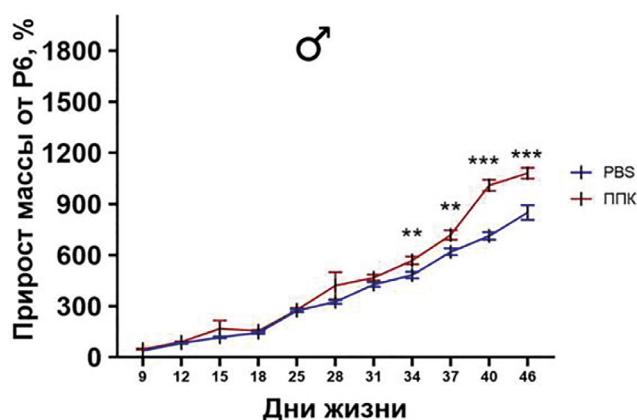


Рис. 1. Влияние пренатального введения пропионовой кислоты на прирост массы тела у самцов крыс Вистар
Fig. 1. Effect of prenatal administration of propionic acid on body weight gain in male Wistar rats

Примечание: **, *** — $p < 0,01$, $p < 0,001$ по сравнению с группой «Контроль» соответственно.

Note: **, *** — $p < 0,01$, $p < 0,001$ compared to the "Control" group, respectively.

повышенную возбудимость, раздражительность и негативную эмоциональность [3]. ППК приводит к внутриклеточному ацидозу и нарушает синтез и высвобождение нейротрансмиттеров [18]. Социальный дефицит, выявленный в тестах «Материнский запах» и «Парный тест» у крыс групп «ППК» может быть связан с нарушением регуляции окситоцина и дофамина [3, 10, 19–21]. Агрессивность животных с РАС, вызванным пренатальным введением ППК в «Парном тесте», а также гиперлокомоция в могут быть также связаны с увеличением уровня серотонина в головном мозге [18], повышенным уровнем возбуждающих медиаторных аминокислот, таких как глутамат, и сниженным уровнем тормозных аминокислот (ГАМК, глицин, таурин) [19, 20]. Выявленное снижение исследовательской деятельности может быть ассоциировано с нарушением регуляции дофаминергической системы [21].

Таким образом, пренатальное введение ППК в высоких дозах оказывает ряд нейротоксических эффектов, индуцируя стойкие патологические биохимические и поведенческие аутичноподобные особенности у грызунов, что позволяет считать данную модель адекватной и пригодной для изучения средств фармакологической коррекции РАС.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication

Funding

The study was performed without external funding.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Бояркин Валентин Сергеевич

Автор, ответственный за переписку

аспирант, м. н. с. лаборатории фармакологии психических заболеваний, отдела нейропсихофармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: bojarkin_vs@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8167-0406>

Valentin S. Boyarkin

Corresponding author

Postgraduate student, Junior Researcher at the Laboratory of Pharmacology of Mental Diseases, Department of Neuropsychopharmacology, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: bojarkin_vs@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8167-0406>

Капица Инга Геннадиевна

к. б. н., в. н. с., начальник отдела интеллектуальной собственности ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4487-0991>

Воронина Татьяна Александровна

д. м. н., профессор, г. н. с., руководитель отдела нейропсихофармакологии, заведующий лабораторией фармакологии психических заболеваний ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

Inga G. Kapitsa

PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Head of the Intellectual Property Department, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4487-0991>

Tatiana A. Voronina

PhD, Dr. Sci. (Med.), professor, Chief Scientific Officer, Head of the Department of Neuropsychopharmacology, Head of the Laboratory of Pharmacology of Mental Diseases, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

Список литературы / References

1. Mehan S, Rahi S, Tiwari A, et al. Adenylate cyclase activator forskolin alleviates intracerebroventricular propionic acid-induced mitochondrial dysfunction of autistic rats. *Neural Regen Res.* 2020;15(6):1140-1149. doi: 10.4103/1673-5374.270316.
2. Foley KA, Ossenkopp KP, Kavaliers M, Macfabe DF. Pre- and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner. *PLoS One.* 2014;9(1):e87072. doi: 10.1371/journal.pone.0087072.
3. Sharma AR, Batra G, Saini L, et al. Valproic acid and propionic acid modulated mechanical pathways associated with autism spectrum disorder at prenatal and neonatal exposure. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2022;21(5):399-408. doi: 10.2174/1871527320666210806165430.
4. Vuong HE, Hsiao EY. Emerging roles for the gut microbiome in autism spectrum disorder. *Biological Psychiatry.* 2017;81(5):411-423. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.08.024.
5. Kwak M, Kim SH, Kim HH, et al. Psychobiotics and fecal microbial transplantation for autism and attention-deficit/hyperactivity disorder: microbiome modulation and therapeutic mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13. doi: 10.3389/fcimb.2023.1238005.
6. Hu T, Dong Y, He C, et al. The gut microbiota and oxidative stress in autism spectrum disorders (ASD). *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:8396708. doi: 10.1155/2020/8396708.
7. Mepham JR, MacFabe DF, Boon FH, et al. Examining the non-spatial pretraining effect on a water maze spatial learning task in rats treated with multiple intracerebroventricular (ICV) infusions of propionic acid: Contributions to a rodent model of ASD. *Behav Brain Res.* 2021; 403:113140. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113140.
8. Wang L, Christoffersen CT, Sorich MJ, et al. Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Dig Dis Sci.* 2012;57(8):2096-2102. doi: 10.1007/s10620-012-2167-7.
9. Abdelli LS, Samsam A, Naser SA. Propionic acid induces gliosis and neuro-inflammation through modulation of PTEN/AKT pathway in autism spectrum disorder. *Sci Rep.* 2019;9(1):8824. doi: 10.1038/s41598-019-45348-z
10. MacFabe DF, Cain DP, Rodriguez-Capote K, et al. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res.* 2007;176(1):149-169. doi: 10.1016/j.bbr.2006.07.025.
11. Meekins MM, MacFabe DF, Mepham JR, et al. Propionic acid induced behavioural effects of relevance to autism spectrum disorder evaluated in the hole board test with rats. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2020;97:109794. doi: 10.1016/j.pnpbp.2019.109794.
12. Choi J, Lee S, Won J, et al. Pathophysiological and neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192925. doi: 10.1371/journal.pone.0192925.
13. González-Cano SI, Camacho-Abrego I, Diaz A, et al. Prenatal exposure to propionic acid induces altered locomotion and reactive astrogliosis in male rats. *J Chem Neuroanat.* 2021;117:102011. doi: 10.1016/j.jchemneu.2021.102011.
14. Foley KA, MacFabe DF, Kavaliers M, Ossenkopp KP. Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to lipopolysaccharide, and prenatal and postnatal exposure to propionic acid, on acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorders. *Behav Brain Res.* 2015;278:244-256. doi: 10.1016/j.bbr.2014.09.032.
15. Малышев А.В., Разумкина Е.В., Рогозинская Э.Я. и др. Поведение и функциональное состояние дофаминергической системы мозга у детенышей депрессивных крыс линии WAG/RIJ. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* 2014;64(3):334-346. [Malyshev AV, Razumkina EV, Rogozinskaya EY, et al. Behavior and Functional State of the Dopaminergic Brain System in Pups of Depressive WAG/Rij Rats. *Zh Vyssh Nerv Deyat Im I P Pavlova.* 2014;64(3):334-46. (In Russ.)] doi: 10.7868/S004446714030101.
16. Mirza R, Sharma B. Selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor- α protects propionic acid induced autism-like phenotypes in rats. *Life Sci.* 2018;214:106-117. doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.045.
17. Daghestani MH, Selim ME, Abd-Elhakim YM, et al. The role of apitoxin in alleviating propionic acid-induced neurobehavioral impairments in rat pups: The expression pattern of Reelin gene. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:48-56. doi: 10.1016/j.biopharm.2017.06.034.
18. Shams S, Foley KA, Kavaliers M, et al. Systemic treatment with the enteric bacterial metabolic product propionic acid results in reduction of social behavior in juvenile rats: Contribution to a rodent model of autism spectrum disorder. *Dev Psychobiol.* 2019;61(5):688-699. doi: 10.1002/dev.21825.
19. Zhao F, Zhang H, Wang P, et al. Oxytocin and serotonin in the modulation of neural function: Neurobiological underpinnings of autism-related behavior. *Front Neurosci.* 2022;16: 919890. doi: 10.3389/fnins.2022.919890
20. Paudel R, Raj K, Gupta YK, et al. Oxiracetam and zinc ameliorates autism-like symptoms in propionic acid model of rats. *Neurotox Res.* 2020;37(4):815-826. doi: 10.1007/s12640-020-00169-1.
21. Mandic-Maravic V, Grujicic R, Milutinovic L, et al. Dopamine in autism spectrum disorders – focus on D2/D3 partial agonists and their possible use in treatment. *Front Psychiatry.* 2022;12:787097. doi: 10.3389/fpsyg.2021.787097.



Фармакокинетика потенциального противоэпилептического средства ГИЖ-298 у крыс после различных режимов дозирования

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

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация

На крысах изучена фармакокинетика соединения ГИЖ-298 при разных режимах дозирования. Целью настоящего исследования явилось изучение ФК ГИЖ-298 после его многократного внутрижелудочного введения.

Методы. Исследование проведено на беспородных крысах-самцах. Концентрации ГИЖ-298 в плазме крови животных определяли методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Оценку фармакокинетических параметров проводили модельно-независимым методом.

Результаты. После однократного и многократного (4 раза с интервалом дозирования 3 ч) внутрижелудочного введений в дозе 60 мг/кг исследуемое вещество в плазме крови животных определялось на протяжении 4 ч. Режим введения ГИЖ-298 не повлиял на величину его периода полувыведения и среднее время удерживания в организме. Установлено, что ГИЖ-298 кумулируется в организме крыс.

Ключевые слова: фармакокинетика; противосудорожное средство; ГИЖ-298; кумуляция

Для цитирования:

Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Жердев В. П. Фармакокинетика потенциального противоэпилептического средства ГИЖ-298 у крыс после различных режимов дозирования. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(2):57–61. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-57-61>. EDN: GCFORG

Поступила: 28.05.2024. В доработанном виде: 12.06.2024. Принята к печати: 27.06.2024. Опубликована: 30.06.2024.

Pharmacokinetics of a potential antiepileptic drug GIZh-298

© Gennadiy B. Kolyvanov, Alexander A. Litvin, Oxana Yu. Kravtsova, Oxana G. Gribakina, Vladimir P. Zherdev
Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract

GIZh-298 pharmacokinetics was studied in rats after different dosage regimens.

The aim of this study was to study GIZh-298 pharmacokinetics after its multiple intragastric administration.

Methods. The study was conducted on outbred male rats. The concentrations of GIZh-298 in the blood plasma were determined by HPLC with mass-spectrometric detection. Pharmacokinetic parameters were evaluated using a model-independent method.

Results. After single and multiple (4 times with a dosage interval of 3 hours) intragastric administrations at 60 mg/kg dose, the test substance in the blood plasma was determined for 4 hours. The mode of administration of GIZh-298 did not affect the value of its half-life and the mean residence time. It has been established that GIZh-298 accumulates in the rats.

Keywords: preclinical pharmacokinetics; antiepileptic drug; tandem HPLC-mass spectrometry; accumulation

For citations:

Kolyvanov GB, Litvin AA, Kravtsova OYu, Gribakina OG, Zherdev VP. Pharmacokinetics of a potential antiepileptic drug GIZh-298. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(2):57–61. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-2-57-61>. EDN: GCFORG

Received: 28.05.2024. Revision received: 12.06.2024. Accepted: 27.06.2024. Published: 30.06.2024.

Введение / Introduction

Противосудорожные препараты являются наиболее распространёнными в терапии эпилептических судорог, однако приблизительно 30 % пациентов фармакорезистентны к ним, поэтому создание новых соединений, обладающих высокой противосудорожной активностью в сочетании с минимальными побочными эффектами, является на сегодняшний день актуальной задачей [1].

Среди производных оксимов 4-бензоилпиридинов с противосудорожным действием наибольшей активностью и наименьшей токсичностью обладал О-2-морфолиноэтилоксим 4-бензоилпиридина оксалат (рабочий шифр — ГИЖ-298) [2]. Это соединение устраниет первично-генерализованные судороги в тестах антагонизма с максимальным электрошоком и коразолом в дозах 0,5–100 мг/кг у грызунов внутрибрюшинно (в/б). ГИЖ-298 имеет большую терапевтическую широту, поскольку LD₅₀ после в/б введения

составляет 316 мг/кг (мыши) [3]. Установлено, что через 50 мин после однократного в/б введения крысам (60 мг/кг) ГИЖ-298 многократно снижал число продолжительных генерализованных высокоамплитудных разрядов в ипси-, контролатеральной коре (в 46 раз), гиппокампе и гипоталамусе (в 28 раз), вызванных гомоцистеином тиалактона, и у 100 % животных устранил генерализованные тонико-клонические судороги, возникающие в развёрнутой стадии эпилептического статуса [4]. Полученные данные демонстрируют высокий потенциал ГИЖ-298 для дальнейшего изучения в качестве противоэпилептического препарата.

Необходимым этапом разработки оригинального лекарственного средства (ЛС) является доклиническое изучение его фармакокинетики (ФК) [5]. Ранее на крысах была изучена ФК соединения ГИЖ-298 при разных путях введения. После однократного внутрьжелудочного (в/ж) и внутривенного (в/в) введений в дозе 60 мг/кг исследуемое вещество в плазме крови животных определялось на протяжении 4 ч. Период полувыведения ГИЖ-298 из плазмы крови составил 0,48 ч после в/в введения и 0,66 ч после в/ж. Абсолютная биодоступность соединения ГИЖ-298 после однократного в/ж введения составила 64,5 % [6]. Целью настоящего исследования явилось изучение ФК ГИЖ-298 после его многократного в/ж введения. Результаты ФК исследования после многократного введения ЛС необходимо сопоставить с данными его ФК, полученными после однократного введения. Таким образом, представляется возможным оценить изменения в выведении ЛС и предсказать уровень его стационарной концентрации (в пределах интервала дозирования) по данным, полученным после его однократного введения.

Материалы и методы / Materials and methods

В исследовании использовали фармацевтическую субстанцию ГИЖ-298 — О-2-морфолиноэтилоксим 4-бензоилпиридина оксалата (серия 221222), синтезированную в лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», как описано ранее [3]. Субстанция представляет собой гомогенный порошок белого цвета, растворима в воде, диметилсульфоксиде, умеренно растворима в этиловом спирте, нерастворима в хлороформе.

Исследование проводили на половозрелых белых беспородных крысах-самцах с массой тела 220 ± 30 г. Животные содержались в лабораторном виварии при $20-22$ °C, относительной влажности воздуха 45–65 %, имели свободный доступ к корму и воде. Эксперименты проводили в соответствии с «Руководством по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» (Рекомендации коллегии Совета Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. №33).

Фармацевтическую субстанцию ГИЖ-298 вводили животным в дозе 60 мг/кг в виде суспензии в 1 % крахмальном клейстере. Содержание ЛС определяли в плазме крови до введения (контроль) и через 0,083; 0,25; 0,5; 1; 2; 3 и 4 ч после его однократного введения и через 0,25; 0,5; 1; 2; 3 и 4 ч после четвёртого введения (всего 4 введения с интервалом дозирования 3 ч.) Считается, что состояние равновесия достигается через 4–5 периодов полувыведения ЛС [7]. В нашем исследовании интервал дозирования (τ) составил 3 ч, что составило более 4 периодов полувыведения ГИЖ-298. На каждый временной интервал использовали по 3 животных. Образцы крови получали декапитацией крыс с последующим центрифугированием при 13500 об/мин в течение 15 мин для отделения плазмы (антикоагулянт 5 % К₂ЭДТА). Далее образцы плазмы крови замораживали при -40 °C и хранили без добавления консервантов до анализа.

Количественное определение ГИЖ-298 в плазме крови животных проводили с помощью валидированной методики высокоеффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [8].

На основании данных «концентрация (С, нг/мл) — время (t, ч)» непараметрическим методом интегральных статистических моментов были рассчитаны основные ФК параметры [9, 10].

$AUC_{0-\tau}$ (нг·ч/мл) — площадь под ФК кривой «концентрация ЛС — время». $AUC_{0-\tau}$ рассчитывается с использованием линейно-логарифмического метода трапеций от момента введения до конкретного временного интервала;

$AUC_{0-\tau}$ (нг·ч/мл) — площадь под ФК кривой «концентрация ЛС — время» рассчитывается с использованием линейно-логарифмического метода трапеций от момента введения до τ ;

C_{\max} (нг/мл) — максимальная концентрация ЛС в плазме крови при внесосудистом введении;

T_{\max} (ч) — время достижения максимальной концентрации ЛС в плазме крови при внесосудистом введении;

k_{el} (1/ч) — константа скорости элиминации — параметр, характеризующий скорость выведения вещества из плазмы крови — абсолютное значение наклона конечного логарифмически линейного участка, идентифицированного на ФК кривой;

$t_{1/2}$ (ч) — период полувыведения — период, за который выводится половина введённой и всосавшейся дозы ЛС, рассчитывается, как $t_{1/2} = \ln 2 / k_{el}$;

MRT (ч) — среднее время удерживания ЛС в организме.

Результаты и их обсуждение / Results and Discussion

Усреднённые ФК профили ГИЖ-298 в плазме крови крыс после различных режимов введения представлены на рис. 1. Соответствующие ФК характеристики исследуемого соединения в плазме крови животных представлены в табл. 1.

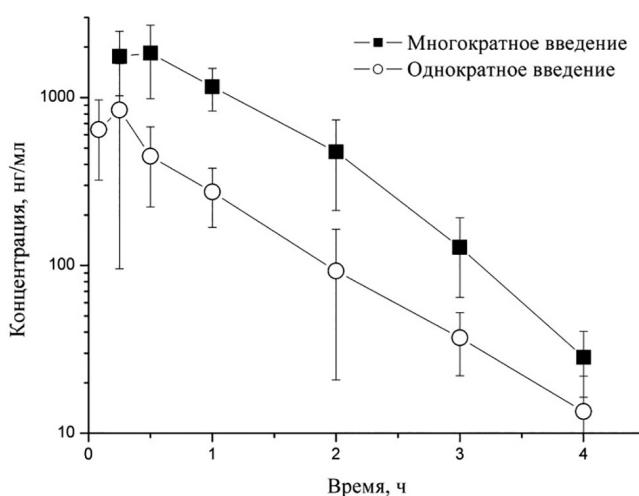


Рис. 1. Фармакокинетические профили ГИЖ-298 в плазме крови крыс после различных режимов дозирования в дозе 60 мг/кг, многократное введение — 4 раза с интервалом дозирования — 3 ч ($n = 3$; среднее \pm SD)

Fig. 1. Pharmacokinetic curves of GIZh-298 in the rat blood plasma after single and multiple (4 times within 3 hours of each other) administrations in dose 60 mg/kg, ($n = 3$; mean \pm SD)

Для достижения стационарных концентраций ЛВ в организме животного/человека, независимо от пути введения, используют повторяющееся дозирование через одинаковые промежутки времени (интервал дозирования — τ). Если рассматривать динамику концентрации ГИЖ-298 в рамках отдельного интервала дозирования (см. рис. 1), то можно отметить, что концентрация сначала быстро растёт, достигая своего максимума уже к 0,25 ч после введения, и далее падает в соответствии с соотношением скоростей всасывания и распределения/выведения.

Зная константу скорости элиминации ЛС или время его полувыведения, можно с определённой долей достоверности предсказать степень его кумуляции при повторяющемся режиме дозирования. Так, если ГИЖ-298 вводить с интервалом дозирования, равным времени его полувыведения (0,7 ч, табл. 1) кумуляция в стационарном состоянии будет приблизительно в два раза больше по сравнению с первой дозой, т. е. C_{max} в стационарном состоянии будет в два раза превышать аналогичный параметр после введения первой дозы.

Для облегчения расчёта схем дозирования ЛВ часто используют среднюю стационарную концентрацию в течение интервала дозирования (C_{avg}), которую можно найти по формуле:

$$C_{\text{avg}} = \frac{\int_0^\tau C(t)dt}{\tau} = \frac{AUC_{0-\tau}}{\tau}, \quad (1)$$

где $AUC_{0-\tau}$ — площадь под ФК кривой от 0 до τ (3 ч) [10, 11].

Таблица 1

Фармакокинетические параметры ГИЖ-298 в плазме крови крыс после различных режимов введения в дозе 60 мг/кг

Table 1

Pharmacokinetic parameters of GIZh-298 in the rat blood plasma after single and multiple administrations in dose 60 mg/kg

Параметр	Размерность	Кратность введения	
		4	1
τ	ч	3	—
C_{max}	нг/мл	1839,9	844,0
T_{max}	ч	0,50	0,25
$AUC_{0-\tau}$	нг/мл·ч	2741,6	786,5
$AUC_{0-\tau}$	нг/мл·ч	—	742,1
C_{avg}	нг/мл	247,4	—
R_{ac}	—	2,1 (для C_{max}) 3,9 (для $AUC_{0-\tau}$)	—
k_{el}	ч ⁻¹	1,21	1,00
$t_{1/2}$	ч	0,6	0,7
MRT	ч	1,1	1,0

В нашем исследовании C_{avg} составила 247,4 нг/мл, что в 3,4 и 7,4 раза ниже C_{max} после однократного и 4-кратного введения ГИЖ-298, соответственно. Таким образом, при разработке режима многократного (хронического) введения исследуемого ЛС экспериментальным животным следует увеличить интервал дозирования до 6–8 ч.

В то же время степень кумуляции препарата определяют R_{ac} (assimilation ratio — кумуляционное соотношение), сравнивая величины C_{max} либо AUC после первого и n -го введений ЛС, соответственно [9, 12]. Величина R_{ac} ГИЖ-298 для C_{max} составила 2,1 и для $AUC_{0-\tau}$ — 3,9, соответственно. Полученные данные указывают, что ГИЖ-298 кумулируется в организме крыс. В доступной нам справочной литературе однозначных указаний о том, что то или иное значение R_{ac} является критическим с точки зрения безопасности дозирования препаратов, отсутствует. Более того, в практической медицине пациентам часто назначают препараты с большим периодом полувыведения, например, дiazепам, фенобарбитал, дигоксин, амиодарон и др. [7]. Средние оценки периодов полувыведения этих препаратов превышают сутки, но дозировать их принято один или несколько раз в сутки. В этом случае кумуляция препарата значительна. И при проявлении нежелательных реакций дозу препарата снижают. Ещё одним аргументом в пользу того, что кумуляция ГИЖ-298 в плазме крови крыс некритична, говорят величины дозонезависимых параметров — $t_{1/2}$ и среднего времени удерживания ЛС в организме (MRT, табл. 1). Из табл. 1 видно, что с ростом числа доз ГИЖ-298

эти показатели практически не изменились. Исходя из полученных нами данных можно заключить, что в случае успешного продвижения ГИЖ-298 в практику следует учитывать эффект кумуляции.

Заключение/Conclusion

В ходе исследования оценивалась фармакокинетика нового потенциального противоэпилептического средства ГИЖ-298 у крыс после различных режимов введения (однократного и 4-кратного). На основании рассчитанных фармакокинетических параметров выявлен кумулирующий эффект исследуемого соединения..

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

Funding

The work was carried out without sponsorship.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Колыванов Геннадий Борисович

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>
РИНЦ SPIN-код: 2538-8639

Литвин Александр Алексеевич

Автор, ответственный за переписку
д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
e-mail: litvin_aa@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>
РИНЦ SPIN-код: 6193-5770

Кравцова Оксана Юрьевна

к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>
РИНЦ SPIN-код: 1733-2330

Gennady B. Kolyvanov

PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Pharmacokinetics, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>
RSCI SPIN code: 2538-8639

Alexander A. Litvin

Corresponding author

PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Pharmacokinetics, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
e-mail: litvin_aa@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>
RSCI SPIN code: 6193-5770

Oxana Yu. Kravtsova

PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Pharmacokinetics, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>
RSCI SPIN code: 1733-2330

Грибакина Оксана Геннадьевна

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4604-4346>
РИНЦ SPIN-код: 6266-8161

Жердев Владимир Павлович

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией
фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных
и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва,
Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>
РИНЦ SPIN-код: 2213-9592

Oxana G. Gribakina

PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Scientist of the Laboratory of Pharmacokinetics, Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4604-4346>
RSCI SPIN code: 6266-8161

Vladimir P. Zherdev

PhD, Dr. Sci. (Med.), professor, Head of laboratory pharmacokinetics Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>
RSCI SPIN code: 2213-9592

Список литературы / References

1. Mensah JA, Johnson K, Reilly CA, et al. Evaluating the efficacy of prototype antiseizure drugs using a preclinical pharmacokinetic approach. *Epilepsia*. 2022 Nov;63(11):2937-2948. doi: 10.1111/epi.17402.
2. Патент РФ на изобретение № 2643091 С2 / 31.01.2018. Бюл. №4. Дурнев А.Д., Воронина Т.А., Литвинова С.А., и др. Производные оксимов 4-бензоилпиридина, обладающие противосудорожной активностью, как средства лечения эпилепсии и пароксизмальных состояний. [Patent RU 2643091 С2/31.01.2018. Byul. №4 Durnev AD, Voronina TA, Litvinova SA, et al. 4-Benzoylpyridine oxime derivatives having anticonvulsant activity as agents for treatment of epilepsy and paroxysmal states. (In Russ.)]. Доступно по: https://patents.s3.yandex.net/RU2643091C2_20180131.pdf. Ссылка активна на 24.05.2024.
3. Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Неробкова Л.Н., и др. Новое производное оксимов 4-бензоилпиридинов ГИЖ-298, обладающее противосудорожной активностью. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2017;(1):22-26. [Zhmurenko LA, Mokrov GV, Nerobkova LN, et al. Novel 4-benzoylpyridine oxime derivative GIZH-298 with aticonvulsant activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2017;(1):22-26. (In Russ.)].
4. Гайдуков И.О., Литвинова С.А., Воронина Т.А., и др. Исследование противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилпиридина (ГИЖ-298) и валпроевой кислоты на модели эпилептического статуса у крыс с кобальт-индуцированным очагом. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2017;9(2):57-66. [Gaidukov IO, Litvinova SA, Voronina TA, et al. 4-Benzoylpyridine oxime derivative (GIZH-298) versus valproic acid: the anticonvulsant potential effect in a model of epilepsy in rats with cobalt-induced lesions. *Epilepsy and paroxysmal conditions. [Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya]* 2017;9(2):57-66 (In Russ.)]. doi: 10.17749/2077-8333.2017.9.2.057-066.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики новых лекарственных средств / Миронов А.Н. (ред.). М.: Гриф и К, 2012. С. 865-880. [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Metodicheskie rekommendacii po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij farmakokinetiki novyh lekarstvennyh sredstv. Mironov AN (ed.). Moscow: Grif and K, 2012. P.865-880. (In Russ.)]. Доступно по: <https://clck.ru/3BEMMg>. Ссылка активна на 24.05.2024.
6. Грибакина О.Г., Кравцова О.Ю., Литвин А.А., и др. Фармакокинетика потенциального противоэпилептического средства ГИЖ-298 у крыс. *Экспер. и клин. фармакол.* 2023;86(5):40-44. [Gribakina OG, Kravtsova OYu, Litvin AA, et al. Pharmacokinetics of the potential pharmacological substance GIZh-298 in rats. *Exper and Clin pharmacol.* 2023;86(5):40-44. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0869-2092-2023-86-5-40-44.
7. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение / Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б.; Рос. акад. мед. наук. Москва : Изд-во Рос. акад. мед. наук, 2003. 208 с. [Sergienko VI, Gelliff R, Bondareva IB; RAMN. *Prikladnaya farmakokinetika: osnovnye polozheniya i klinicheskoe primenenie*. Moscow: Izdatelstvo RAMN, 2003. (In Russ.)]. ISBN 5790100317.
8. Бочков П. О., Кравцова О. Ю., Колыванов Г. Б., и др. Количественное определение потенциального противосудорожного средства ГИЖ-298 в плазме крови крыс методом высокоеффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(3):37-45. [Bochkov PO, Kravtsova OYu, Kolyvanov GB, Litvin AA, Boyko SS, Zherdev VP. Quantification of a potential anticonvulsant drug GIZh-298 in rat plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(3):37–45. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2022-3-37-45.
9. Фармакокинетика / Н.Н. Каркищенко, В.В. Хоронько, С.А. Сергеева, В.Н. Каркищенко; под ред. Г.И. Должич. Ростов н/Д : Феникс, 2001. 381. [Farmakokinetika. Karkishenko NN, Khoronko VV, Sergeeva SA, Karkishenko VN; Ed by Dolzhich GI. Rostov-na-Donu : Fenix, 2001. (In Russ.)]. ISBN 5-222-01504-1.
10. Основы фармакокинетики / И.И. Мирошниченко. Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2002. 185 с. [Osnovy farmakokinetiki. Miroshnichenko II. Moscow: Geotar-Med, 2002 (In Russ.)]. ISBN 5-9231-0211-0.
11. Tsaioun K (ed), Kate SA (ed). ADMET for medicinal chemists: a practical guide. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2011. ISBN: 978-0-470-48407-4.
12. Vogel HG, Maas J, Gebauer A. Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2011. ISBN 9783540898924. doi: 10.1007/9783540898917. Доступно по: <http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/48230/1/Hans%20Gerhard%20Vogel.pdf>. Ссылка активна на 24.05.2024.

УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ



Учебное пособие описывает методологию эффективного управления проектом по изысканию, разработке и выводу на фармацевтический рынок лекарственных средств, начиная с этапа поиска перспективных химических соединений, проведения доклинических испытаний веществ-кандидатов, клинических исследований лекарств-кандидатов, фармаконадзора, управления данными, анализа полученных данных, составления окончательного отчёта об исследовании, получения регистрационного удостоверения, публикации результатов, заканчивая организацией пострегистрационных исследований безопасности, проведением неинтervенционных и фармакоэпидемиологических исследований, а также процесса обеспечения качества, проведения аудита и инспекций уполномоченных органов здравоохранения, создания стандартных операционных процедур, архивирования документов исследования.

Выходные данные: Управление клиническими исследованиями / под общ. ред. Белоусова Д. Ю., Зырянова С. К., Колбина А.С. — 1-е изд. — М.: Буки Веди: Издательство ОКИ, 2017. — 676 с.: ил. ISBN 978-5-4465-1602-5



Это полезный и компактный ресурс, пошаговый алгоритм по подготовке Предложения на включение лекарственных препаратов в ограничительные Перечни с изложением методологии проведения сравнительной оценки эффективности и безопасности, а также экономических последствий их применения. После прочтения книги процесс включения в Перечни сложится из разрозненных пазлов в единую картину.

Выходные данные: Включение лекарственных препаратов в ограничительные перечни: пошаговый алгоритм / под общ. ред. Белоусова Д. Ю., Зырянова С. К., Колбина А. С. — М. : Издательство ОКИ : Буки Веди, 2019. — 252 с. : ил. ISBN 978-5-4465-2555-3



В книге описывается методология фармаконадзора, организация пострегистрационных исследований безопасности, фармакоэпидемиологических и неинтervенционных исследований, организация системы фармаконадзора в фармацевтической компании, чрезвычайные ситуации в клинических исследованиях, особенности фармаконадзора у беременных и кормящих.

Выходные данные: Фармаконадзор / под общ. ред. Колбина А. С., Зырянова С. К., Белоусова Д. Ю. — М. : Издательство ОКИ : Буки Веди, 2019. — 248 с.: ил. ISBN 978-5-4465-2373-3



Рекомендации раскрывают аспекты планирования и проведения исследований реальной клинической практики для формирования основанных на них доказательств. Впервые в России обобщены термины и определения касающиеся исследований реальной клинической практики. Описаны правовые вопросы, методология планирования и проведения исследований реальной клинической практики, методы сбора данных, этическая экспертиза и статистический анализ таких исследований.

Выходные данные: Исследования реальной клинической практики / под общ. ред. Колбина А. С. — М. : Издательство ОКИ : Буки Веди, 2020. — 208 с.: ил. ISBN 978-5-4465-2902-5.



Руководство предназначено для повседневного использования членами Комитетов по этике, при экспертной оценке биомедицинских исследований; специалистами, занимающимися проведением таких исследований; работающими в клиниках, фармацевтических компаниях, контрактных исследовательских организациях, руководителями научных и клинических проектов, представителями регулирующих органов, научно-исследовательских институтов, высших аттестационных комиссий.

Выходные данные: Этическая экспертиза биомедицинских исследований: руководство для комитетов по этике / под общей ред. А.Л. Хохлова. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во ОКИ, 2021. — 792 с.: ил.

Приобрести книги можно по тел. +7 (916) 986-04-65 или e-mail: eva88@list.ru
ООО «Издательство ОКИ», <https://izdat-oki.ru>

