

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

ФАРМАКО КИНЕТИКА и ДИНАМИКА



№1.2022



Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

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

Зам. главного редактора

Смирнов Валерий Валерьевич

д. фарм. н., Москва

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д. б. н., Москва

Редакционная коллегия

**Бондарева
Ирина Борисовна**
д. б. н., Москва

**Воронина
Татьяна Александровна**
заслуженный деятель науки
РФ, д. м. н., профессор, Москва

Громова Ольга Алексеевна
д. м. н., профессор, Москва

Дурнев Андрей Дмитриевич
член-корр. РАН, д. м. н.,
профессор, Москва

Ковалёв Георгий Иванович
д. м. н., профессор, Москва

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

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

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

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

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

**Сариов Абрек
Куангалиевич**
д. м. н., профессор, Москва

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

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

Сычёв Дмитрий Алексеевич
член-корр. РАН, д. м. н.,
профессор, Москва

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

**Шевченко Роман
Владимирович**
к. м. н., Москва

**Выпускающая группа
Белоусов
Дмитрий Юрьевич**
Ответственный за выпуск
журнала
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

**Афанасьева
Елена Владимировна**
Генеральный директор
ООО «Издательство ОКИ»
подписка
+7 (916) 986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
сайт: www.izdat-oki.ru

Жук Елена Владимировна
Дизайн и верстка
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Подписано в печать 30.03.2022 г. Тираж 400 экз.

Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com
115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

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

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

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

Сайты

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

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия
Качественная клиническая практика
Дайджест «Больничная аптека»
Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

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

Центр Фармакоэкономических Исследований
Market Access Solutions
Издательство ОКИ

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Сравнительное изучение влияния производных адамантана
на поведение мышей CD-1 с разным фенотипом устойчивости
внимания

Сухорукова Н. А., Салимов Р. М., Ковалёв Г. И. 3

Ноопепт защищает инфузории *Paramecium caudatum*
от токсического действия соединений тяжёлых металлов

Карпухина О. В., Поварнина П. Ю., Иноземцев А. Н. 9

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Влияние комбинированного применения мексидола
с диклофенаком натрия на выраженность экссудативного
воспаления у крыс при превентивном десятидневном
пероральном введении

Иванова Е. А., Васильчук А. Г., Матюшкин А. И.,
Воронина Т. А. 14

Изучение эффектов диазепама на асцитную карциному
Эрлиха и тревожные реакции у мышей самцов
популяции SHK

Калинина Т. С., Шимширт А. А., Лисицкая К. В.,
Волкова А. В., Кудряшов Н. В. 20

Влияние селанка на морфин-индуцированную
анальгезию в опытах *in vivo*

Надорова А. В., Чернякова И. В., Колик Л. Г. 30

Миметик мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106
оказывает нейропротекторные и нейрорегенеративные
эффекты в условиях экспериментального ишемического
инсульта

Поварнина П. Ю., Антипова Т. А., Логвинов И. О.,
Никифоров Д. М. 36

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение метода *AlphaScreen* и *AlphaLisa* в разработке
лекарственных препаратов и фармакокинетических
исследованиях

Мухаметшина Р. Т., Копейн Д. С., Симонов В. М. 44

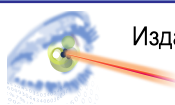
Интерпретация данных фармакокинетики при
доклиническом изучении новых лекарственных средств.
Однократное внутривенное введение

Геодакян С. В. 55

ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Исследование биоэквивалентности комбинированного
препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин
Санофи по сравнению с совместно принимаемыми
двухкомпонентным препаратом Лозап® АМ и
моноккомпонентным препаратом Крестор® с участием
здоровых добровольцев

Хохлов А. Л., Гребенкин Д. Ю., Фаева Е. К., Казей В. И.,
Хохлов А. А., Мирошников А. Е., Лебедева О. В. 61



Chief editor

Zherdev Vladimir

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

Deputy chief editor

Smirnov Valery

Ph.D., Moscow

Executive secretary

Litvin Alexander

Ph.D., Moscow

Editorial Board

Bondareva Irina

Ph.D., Moscow

Voronina Tatiana

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

Gromova Olga

Ph.D., Professor, Ivanovo

Durnev Andrey

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

Kovalev Georgy

Ph.D., Professor, Moscow

Colic Larisa

Ph.D., Professor, Moscow

Kolyanov Gennady

Ph.D., Moscow

Mirzoyan Ruben

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

Rudakova Alla

Ph.D., Professor, St. Petersburg

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Starodubtsev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

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

Tyurenkov Ivan

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

Shevchenko Roman

Ph.D., Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry

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

Afanasyeva Elena

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

Zhuk Elena

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

Signed in print 30.03.2022 r. **Circulation** 400 copies.

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

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiiskay, 8
FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»
Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

You can subscribe via the «Agency «Book-Service» or the catalog
«Press of Russia» — **Index E45072**

Website: www.Pharmacokinetics.ru The journal was registered with the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) on 02/04/2021, the certificate of registration of the mass media PINo.FS77-80349. Copying material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites

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

Journals

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

WEB-portals

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

Center of Pharmacoeconomics Research
Market Access Solutions
Publisher OKI

MECHANISM OF ACTION RESEARCH

- Comparative study of the effects of adamantane derivatives on the behavior of CD-1 mice with different phenotype of attention stability
Sukhorukova NA, Salimov RM, Kovalev GI 3
- Noopept protects ciliates *Paramecium caudatum* cells from the toxic effects of heavy metal compounds
Karpukhina OV, Povarnina PYu, Inozemtsev AN 9

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

- Effect of the combination of mexidol and diclofenac sodium on exudative inflammation in rats after ten-day preventive oral administration
Ivanova EA, Vasilchuk AG, Matyushkin AI, Voronina TA..... 14
- Study of diazepam eDepts on Ehrlich ascites carcinoma and anxiety responses in male SHK mice
Kalinina TS, Shimshir AA, Lisitskaya KV, Volkova AV, Kudryashov NV 20
- Selank effects on morphine-induced analgesia *in vivo* experiments
Nadorova AV, Chernyakova IV, Kolik LG 30
- The mimetic of the brain neurotrophic factor GSB-106 has neuroprotective and neuroregenerative effects in experimental ischemic stroke
Povarnina PYu, Antipova TA, Logvinov IO, Nikiforov DM 36

PHARMACOKINETICS STUDIES

- Application of the *AlphaScreen* and *AlphaLISA* method in drug development and pharmacokinetic studies
Mukhametshina RT, Kopein SD, Simonov VM..... 44
- Interpretation of pharmacokinetic data in preclinical studies of new drugs. Single intravenous administration
Geodakyan SV..... 55

BIOEQUIVALENCE STUDIES

- Bioequivalence study of fixed-dose combination Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi in comparison with coadministered fixed-dose combination Lozap® AM and monocomponent drug Crestor® in healthy subjects
Khokhlov AL, Grebenkin DYU, Faeva EK, Kazey VI, Khokhlov AA, Miroshnikov AE, Lebedeva OV 61

Сравнительное изучение влияния производных адамантана на поведение мышей CD-1 с разным фенотипом устойчивости внимания

Сухорукова Н. А., Салимов Р. М., Ковалёв Г. И.

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

Аннотация. Изучено влияние мемантина (1 и 10 мг/кг/день, в/б), ладастена (50 мг/кг/день, в/б) и циклантана 10 мг/кг/день, в/б) на поведение мышей CD-1, различающихся по фенотипу устойчивости внимания в тесте «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт», после трёхкратного внутрибрюшинного введения. Установлено, что в субпопуляции мышей с исходным дефицитом внимания частично эти производные аминоадамантана восстанавливали уровень внимания. Препараты в равной степени ухудшали внимание в субпопуляции с исходно высоким индексом внимания на 40–47 % относительно контроля, что свидетельствует об отсутствии избирательности эффекта этих производных адамантана в отношении дефицита внимания. Однако данное воздействие не сопровождалось изменением исследовательской и локомоторной активности, что позволяет сделать предположение о перспективности дальнейшего изучения фармакологических эффектов производных адамантана и оптимизации их дозы, и продолжительности введения.

Ключевые слова: дефицит внимания; мемантин; ладастен; циклантан; «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт»; мыши CD-1

Для цитирования:

Сухорукова Н. А., Салимов Р. М., Ковалёв Г. И. Сравнительное изучение влияния производных адамантана на поведение мышей CD-1 с разным фенотипом устойчивости внимания. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1):3–8. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-3-8>

Поступила: 24 февраля 2022 г. **Принята:** 02 марта 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

Comparative study of the effects of adamantane derivatives on the behavior of CD-1 mice with different phenotype of attention stability

Sukhorukova NA, Salimov RM, Kovalev GI

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The effect of memantine (1 and 10 mg/kg/day), ladasten (50 mg/kg/day) and cyclantane (10 mg/kg/day) on the behavior of CD-1 mice differing in the phenotype of attention stability in the "closed enriched cross maze" test after three days of intraperitoneal administration was studied. It was found that in a subpopulation of mice with an initial attention deficit, these aminoadamantane derivatives partially restored the level of attention. The drugs equally worsened attention in a subpopulation with an initially high attention index by 40–47 % relative to the control, which indicates the absence of selectivity of the effect of these drugs with respect to attention deficit. However, this effect was not accompanied by a change in exploratory and locomotor activity, which makes it possible to make an assumption about the prospects for further study of the pharmacological effects of adamantane derivatives and optimization of their dose and duration of administration.

Keywords: attention deficit; memantine; ladasten; cyclantane; closed enriched cross maze; CD-1 mice

For citations:

Sukhorukova NA, Salimov RM, Kovalev GI. Comparative study of the effects of adamantane derivatives on the behavior of CD-1 mice with different phenotype of attention stability. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):3–8. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-3-8>

Received: February 24, 2021. **Accepted:** March 02, 2022. **Published:** March 30, 2022

Введение / Introduction

Синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) представляет собой актуальную медико-биологическую проблему, так как его проявления в не-малой степени снижают качество жизни пациентов, выполнение ими разного рода задач и сохраняются, как правило, на протяжении всей жизни. Фармакотерапия СДВГ является действенным инструментом в комплексном подходе при лечении данного заболевания. Согласно используемым на сегодняшний день в западных странах стратегиям, психостимуляторы (например, метилфенидат) являются препаратами «первой линии» при СДВГ [1]. Однако их подтверждённая клиническая эффективность сопряжена с необходимостью увеличения дозы при длительном применении и значимым побочным действием, в первую очередь на

нервную [2] и сердечно-сосудистую системы [3]. Таким образом, актуальным остаётся вопрос изыскания фармакологических средств, обладающих меньшим аддитивным потенциалом, аналогичной переносимостью и сходным профилем фармакологической активности. В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в Опытно-технологическом отделе (проф. Б.М. Пятин) были синтезированы производные 2-адамантана — ладастен (N-(4-бромфенил)адамантан-2-амин, бромантан) и циклантан (1-гидрокси-4-циклогексиламиноадамантана гидрохлорид, АДК-638), обладающие психоактивирующим и антиастеническим действием [4], а в Лаборатории радиоизотопных методов исследований на основе теста «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт» и фенотипирования аутистических мышей CD-1 была разработана и апробирована модель СДВГ, которая базируется на природной

врождённой способности грызунов к ознакомлению с новыми объектами окружающей среды, не является инвазивной и позволяет оценить различные аспекты действия изучаемых веществ [5].

Целью данного исследования было сравнительное изучение поведенческих эффектов производных адамантана — мемантина гидрохлорида (1 и 10 мг/кг), ладастена (50 мг/кг) и циклантана (10 мг/кг) при их внутрибрюшинном введении аутбредным мышам CD-1 в новой экспериментальной модели дефицита внимания.

Материалы и методы исследования/ Materials and methods

Эксперимент проводили на самцах аутбредных мышей CD-1, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ, массой 23–30 г ($n = 255$), которых содержали в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в стандартных условиях при свободном доступе к воде и корму. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96), Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Эксперименты проводили с 10 до 16 ч. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Экспериментальная установка была поставлена ООО «НПК Открытая Наука» (Россия). Ладастен (N-(4-бромфенил)адамантан-2-амин) и циклантан (1-гидрокси-4-циклогексиламино-адамантана гидрохлорид) были синтезированы в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» под руководством профессора *Пятин Б.М.* и к. х-ф. н. *Авдюниной Н.А.* Остальные реактивы были приобретены в коммерческих источниках.

Поведенческие методы исследования (Тест «Закрытый обогащённый крестообразный лабиринт», *Enrichment Discrimination test*).

Грызунов подвергали поведенческому тестированию в закрытом обогащённом крестообразном лабиринте (ЗОКЛ) с помощью программы Enrisset. Тест заканчивался, когда животное совершало 12 визитов в отсеки [5]. Критерием разделения животных на субпопуляции служили значения индекса распознавания новых объектов, определяющегося по формуле:

$$ED\text{-}ratio = 100 \times Tenriched / Tempty,$$

где: Tenriched является временем, проведённым животным в рукавах установки с объектами, а Tempty — временем в пустых рукавах, соответственно.

При отсутствии предпочтения рукавов с новыми объектами индекс распознавания составлял около 100 и менее. В популяции мышей CD-1 присутствовало

2 типа особей, которые проявляли (индекс внимания > 120 , 60–70 % мышей) или не проявляли (индекс внимания < 100 , 30–40 % мышей) внимание к объектам, имеющимся в лабиринте.

Во время 1-го теста производили отбор особей с поведенческими фенотипами **ED-high** ($ED\text{-}ratio > 120$) и **ED-low** ($ED\text{-}ratio < 100$). После отбора грызунов обеих субпопуляций разделяли на контрольную и опытную подгруппы. Изучаемые вещества, растворённые в физрастворе и 0,4 % растворе твина-80 в дистиллированной воде в выбранных дозах, вводили внутрибрюшинно один раз в сутки, контрольной группе вводили физраствор и 0,4 % раствор твина-80 в дистиллированной воде в эквивалентных объёмах. Выбор доз и продолжительности введения основывался на данных, полученных ранее в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Во время 2-го теста, выполнявшегося в той же обстановке через 1 час после заключительной инъекции, оценивали влияние изучаемого вещества на внимание к обстановке у мышей с известным типом исследовательской реакции на объекты, имеющиеся в лабиринте.

Помимо указанного выше индекса распознавания новых объектов, анализ данных позволил выделить следующие показатели поведения:

1. Длина первого цикла патрулирования **F_PtrN** и число циклов патрулирования **PtrlN**, совершённых за время эксперимента; исчисляются числом заходов животного в отсеки лабиринта, совершённых им для обследования обстановки. Данные показатели отражают эффективность исследования лабиринта животным и могут быть использованы для оценки ноотропного действия веществ.

2. Общее время пребывания животного в центральном отсеке лабиринта **T_ChTm** и общее время, проведённое в боковых отсеках **T_GITm**. Данные показатели отражают уровень двигательной активности животного, а также характеризуют интенсивность обследования им новой среды и могут быть использованы для оценки стимулирующего/тимолептического или, наоборот, седативного эффекта вещества.

3. Латентный период **F_ChTm** и продолжительность первого визита в боковой отсек **F_GITm**. Данные показатели отражают уровень тревожности животного в новой обстановке и могут быть использованы для оценки транквилизирующего (анксиолитического) эффекта.

Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью программы Statistica 10.0 согласно «Методическим рекомендациям по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Полученные результаты представлены в виде средних значений с учётом стандартной ошибки среднего ($mean \pm S.E.M$). Различия между субпопуляциями мышей по изучаемым показателям в контрольных и опытных группах оценивали по критерию Манна–Уитни.

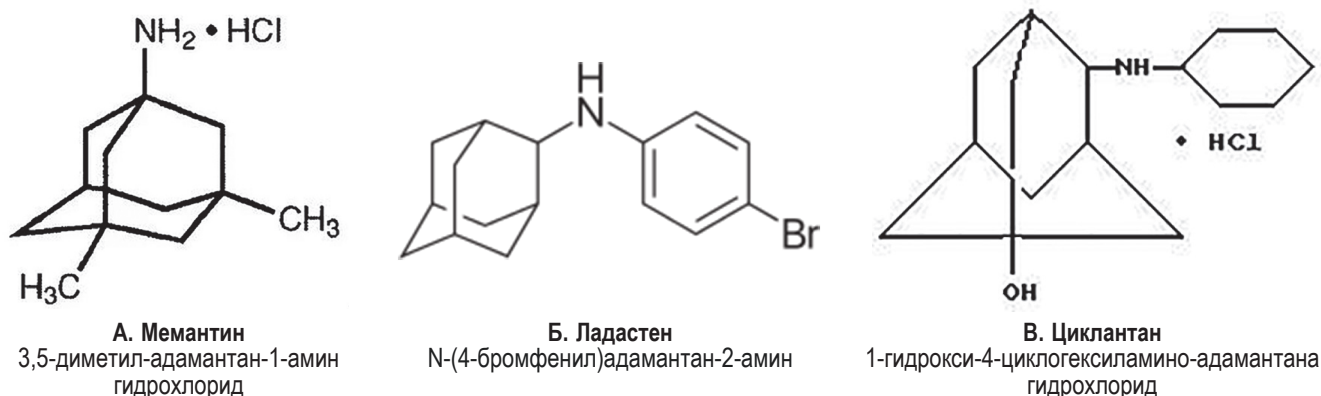


Рис. 1. Производные 1-аминоадамантана (А) и 2-аминоадамантана (Б, В)
 Fig. 1. Derivatives of 1-aminoadamantane (A) and 2-aminoadamantane (Б, В)

Результаты и обсуждение/ Results and discussion

Производные адамантана являются группой соединений, обладающих объёмным и высоколипофильным каркасным ядром в структуре молекулы. Данная особенность строения позволяет взаимодействовать с биологическими мембранами и включёнными в них рецепторными комплексами. Биологическая активность производных адамантана характеризуется низкой токсичностью, широким спектром фармакологического действия и может быть модифицирована введением дополнительных заместителей, в том числе и сложных [4].

В результате поведенческого типирования с использованием теста «закрытый обогатённый крестообразный лабиринт» были выделены субпопуляции грызунов, различающиеся по природной способности к поддержанию внимания к предъявляемым им предметам в отсеках установки. Фенотип **ED-high**, обладающий большими значениями данного индекса распознавания объектов — **ED-ratio** > 120, был принят за норму. Животные фенотипа **ED-Low** с индексом **ED-ratio** < 100 демонстрировали исходный дефицит внимания в условиях теста, данный показатель был снижен в 5,5–5,8 раз в контрольных группах по сравнению с его значениями у **ED-high**. Различия в поведении двух субпопуляций не были обусловлены ни когнитивными способностями, ни двигательной активностью и тревожностью (табл. 1, 2, 3). Эта межсубпопуляционная особенность сохранялась у животных достаточно стабильно [6].

При анализе результатов, полученных при поведенческом тестировании грызунов фенотипа **ED-Low**, было обнаружено нормализующее влияние адамантанов на индекс распознавания новых объектов в ЗОКЛ. Мемантин в обеих исследуемых дозах увеличивал

значения индекса в 2,6–2,7 раза в опытных группах в сравнении с контролем, получавшим инъекции физраствора (см. табл. 1). Производные 2-аминоадамантана, ладастен и циклантан, оказывали более выраженное воздействие на индекс **ED-ratio** (**Obj_tR**): под влиянием ладастена значения **ED-ratio** возрастали в 4,8 раза (см. табл. 2), а после цикланта — в 3,6 раз (см. табл. 3). При этом эффект всех трёх препаратов не достигал значений контрольной группы сравнения **ED-high**. Кроме того, препараты не изменяли параметров когнитивного поведения и тревожности. Исключение составил мемантин, который в дозе 10 мг/кг укорачивал латентное время первого захода, следовательно, что указывает на присутствие анксиолитического компонента в его действии (см. табл. 1).

Однако в данном режиме введения все три препарата в равной степени снижали показатель уровня внимания **ED-ratio** у мышей субпопуляции **ED-high** на 40–47 % относительно контроля, что свидетельствует об отсутствии избирательности эффекта этих производных адамантана в отношении дефицита внимания, характерной для ноотропных препаратов пантогама, фенибута, пирацетама, семакса, изученных нами ранее [7–10]. В этой же субпопуляции циклантан значительно увеличивал тревожность мышей, так как латентный период первого визита в боковой отсек (**F_ChTm**) возрастал с 7,2 с до 9,3 с.

Важно подчеркнуть, что ни мемантин, ни ладастен, ни циклантан не увеличивали двигательную активность, о чём свидетельствует равенство сумм показателей **T_GITm** и **T_ChTm** в обеих субпопуляциях (табл. 1–3). Данное наблюдение можно интерпретировать в качестве признака отсутствия в спектре действия изученных производных значимого компонента, характерного для стандартных психостимуляторов.

Таблица 1

Влияние 3-кратного введения мемантина (1 мг/кг и 10 мг/кг, внутривенно) на показатели поведения субпопуляций аутбредных мышей CD-1 в тесте ЗОКЛ (представлены средние арифметические величины и их стандартные ошибки, $m \pm S.E.M.$)

Table 1

The effect of 3-times administration of memantine (1 and 10 mg/kg/day, i.p.) on the behavior of subpopulations of outbred CD-1 mice in «closed enriched cross maze test» ($m \pm S.E.M.$)

Показатели поведения [^] / Экспериментальные группы	ED-High Контроль (n = 20)	ED-High Мемантин (n = 20)	ED-Low Контроль (n = 15)	ED-Low Мемантин (n = 17)
Ноотропная активность				
F_PtrN (Длина первого цикла патрулирования)	Ф.Р. 1 мг/кг 10 мг/кг	7,2±0,5 — —	— 7,1±0,6 7,4±0,6	6,9±0,7 — —
PatrlN (Общее количество циклов патрулирования)	1 мг/кг 10 мг/кг	1,4±0,2	1,3±0,2 1,4±0,1	1,3±0,1 1,2±0,2 1,5±0,1
Тревожность				
F_ChTm (Латентный период)	Ф.Р. 1 мг/кг 10 мг/кг	9,6±0,6 — —	— 8,6±0,7 7,6±0,7 [#]	9,5±0,8 — —
F_GITm (Длительность 1-го визита в боковой отсек)	Ф.Р. 1 мг/кг 10 мг/кг	6,7±1,0 — —	— 10,1±2,2 8,5±1,2	— 6,5±0,1 —
Двигательная активность				
T_ChTm (Общее время пребывания в Центральном отсеке)	Ф.Р. 1 мг/кг 10 мг/кг	40,9±2,2 — —	— 38,5±3,6 42,8±3,4	46,9±3,6 — —
T_GITm (Общее время пребывания в боковых отсеках)	Ф.Р. 1 мг/кг 10 мг/кг	52,6±2,1 — —	— 57,5±3,5 64,2±3,6 [#]	48,5±1,7 — —
Индекс различения объектов				
Obj_tR (ED-ratio)	Ф.Р. 1 мг/кг 10 мг/кг	334,6±50,4 — —	— 201,6±24,1 [#] 170,6±27,3 [#] 8,5±1,2	61,1±8,3 [*] — —
Примечания: * — статистически значимое отличие между субпопуляциями, Манна-Уитни U-test, $p < 0,05$; # — статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, Манна-Уитни U-test, $p < 0,05$; ^ — пояснения в разделе Материалы и методы.				
Notes: * — statistically significant difference between subpopulations, Mann–Whitney U-test, $p < 0,05$; # — statistically significant difference between control and experimental groups, Mann–Whitney U-test, $p < 0,05$; ^ — explanations are given in the Materials and Methods Section.				

Таблица 2

Влияние 3-кратного введения ладастена (50 мг/кг, внутривенно) на показатели поведения субпопуляций аутбредных мышей CD-1 в тесте ЗОКЛ (представлены средние арифметические величины и их стандартные ошибки, $m \pm S.E.M.$)

Table 2

The effect of 3-times administration of ladasten (50 mg/kg/day, i.p.) on the behavior of subpopulations of outbred CD-1 mice in «closed enriched cross maze test» ($m \pm S.E.M.$)

Показатели поведения [^] / Экспериментальные группы	ED-High Контроль (n = 21)	ED-High Ладастен (n = 22)	ED-Low Контроль (n = 15)	ED-Low Ладастен (n = 18)
Ноотропная активность				
F_PtrN (Длина первого цикла патрулирования)	6,0±0,6	6,0±0,4	6,1±0,7	5,3±0,3
PatrlN (Общее количество циклов патрулирования)	1,5±0,2	1,7±0,1	1,5±0,2	1,5±0,1
Тревожность				
F_ChTm (Латентный период)	9,5±0,7	8,5±0,4	9,3±0,9	8,4±0,7
F_GITm (Продолжительность 1-го визита в боковой отсек)	4,9±0,6	6,5±0,9	5,4±0,7	5,7±0,6
Двигательная активность				
T_T_ChTm (Общее время пребывания в центральном отсеке)	41,4±3,6	50,6±4,4	50,6±5,1	52,8±6,3
T_GITm (Общее время пребывания в боковых отсеках)	50,1±3,1	62,0±4,1 [#]	53,6±6,6	51,1±2,8
Индекс различения объектов				
Obj_tR (ED-ratio)	329,6±43,2	200,7±24,7 [#]	57±9,2 [*]	275,5±37,2 [#]
Примечания: * — статистически значимое отличие между субпопуляциями, Манна-Уитни U-test, $p < 0,05$; # — статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, Манна-Уитни U-test, $p < 0,05$; ^ — пояснения в разделе Материалы и методы.				
Notes: * — statistically significant difference between subpopulations, Mann–Whitney U-test, $p < 0,05$; # — statistically significant difference between control and experimental groups, Mann–Whitney U-test, $p < 0,05$; ^ — explanations are given in the Materials and Methods Section.				

Таблица 3

Влияние 3-кратного введения циклантана (10 мг/кг, внутривенно) на показатели поведения субпопуляций аутбредных мышей CD-1 в тесте ЗОКЛ представлены средние арифметические величины и их стандартные ошибки, $m \pm S.E.M.$)

Table 3

The effect of 3-times administration of cyclantane (10 mg/kg/day, i.p.) on the behavior of subpopulations of outbred CD-1 mice in «closed enriched cross maze test» ($m \pm S.E.M.$)

Показатели поведения [^] / Экспериментальные группы	ED-High Контроль (n = 11)	ED-High Циклантан (n = 12)	ED-Low Контроль (n = 11)	ED-Low Циклантан (n = 10)
Ноотропная активность				
F_PtrN (Длина первого цикла патрулирования)	6,6±0,3	8,2±0,8	6,5±0,8	7,0±0,7
PatrlN (Общее количество циклов патрулирования)	1,2±0,1	1,1±0,2	1,1±0,2	1,6±0,1
Тревожность				
F_ChTm (Латентный период)	7,2±0,5	9,3±0,8[#]	7,8±0,5	8,4±0,6
F_GITm (Продолжительность 1-го визита в боковой отсек)	7,6±1,1	8,2±1,1	6,7±2,1	8,3±1,6
Двигательная активность				
T_ChTm (Общее время пребывания в центральном отсеке)	43,8±3,5	48,1±5,3	49,3±5,4	51,7±6,9
T_GITm (Общее время пребывания в боковых отсеках)	54,5±4,3	47,3±3,9	51,3±5,2	59,3±3,7
Индекс различения объектов				
Obj_tR (ED-ratio)	347,2±49,3	184,1±27,1[#]	60,5±6,7[*]	219,6±25,3[#]
Примечания: * — статистически значимое отличие между субпопуляциями, Манна–Уитни U-test, $p < 0,05$; # — статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, Манна–Уитни U-test, $p < 0,05$; ^ — пояснения в разделе Материалы и методы. Notes: * — statistically significant difference between subpopulations, Mann–Whitney U-test, $p < 0,05$; # — statistically significant difference between control and experimental groups, Mann–Whitney U-test, $p < 0,05$; ^ — explanations are given in the Materials and Methods Section.				

Выводы / Conclusions

1. Аминопроизводные адамантана мемантин (1 и 10 мг/кг/сутки), ладастен (50 мг/кг/сутки) и циклантан (10 мг/кг/сутки) после 3-кратного в/б введения мышам CD-1 с фенотипом сниженного уровня внимания в тесте «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт» частично восстанавливали величину индекса устойчивости внимания.

2. Однако в отношении субпопуляции с фенотипом высокого уровня внимания препараты демонстрировали противоположный эффект, ухудшая индекс на 40–47 % в сравнении с интактным контролем.

3. Ни один из препаратов не влиял на исследовательскую и двигательную активности в обеих субпопуляциях, что позволяет сделать предположение о перспективности дальнейшего изучения эффектов различных производных адамантана и оптимизации их дозы и продолжительности введения.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

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

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания №122020400052-2 «Фармакологическая коррекция цереброваскулярных и когнитивных расстройств с нейрорецепторным анализом».

Financing. This study was performed within the framework of State Task No. 122020400052-2 “Pharmacological correction of cerebrovascular and cognitive disorders with neuroreceptor analysis”.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Сухорукова Наталия Альбертовна
Автор, ответственный за переписку
 e-mail: natalipharm@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6412-4833>
 SPIN-код: 2656-4174
 м. н. с. лаборатории радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Салимов Рамиз Меджидович
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9297-9847>
 д. б. н. в. с. лаборатории радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Ковалёв Георгий Иванович
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8597-7018>
 SPIN-код: 8461-8814
 д. м. н, профессор, заведующий лабораторией радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Sukhorukova Nataliya A.
Corresponding author
 e-mail: natalipharm@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6412-4833>
 SPIN code: 2656-4174
 Junior researcher, Laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Salimov Ramiz M.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9297-9847>
 Dr. Sci. Biological, Lead specialist of the Laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Kovalev Georgy I.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8597-7018>
 SPIN code: 8461-8814
 Dr. Sci. (Med.), professor, Head of the Laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Núñez-Jaramillo L, Herrera-Solis A, Herrera-Morales WV. ADHD: Reviewing the causes and evaluating solutions. *J Pers Med*. 2021;11(3):166. DOI: 10.3390/jpm11030166.
2. Faraone SV. The pharmacology of amphetamine and methylphenidate: Relevance to the neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder and other psychiatric comorbidities. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;87:255–270. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.02.001.
3. Hennissen L, Bakker MJ, Banaschewski T et al. Cardiovascular effects of stimulant and non-stimulant medication for children and adolescents with ADHD: a systematic review and meta-analysis of trials of methylphenidate, amphetamines and atomoxetine. *CNS Drugs*. 2017;31(3):199–215. DOI: 10.1007/s40263-017-0410-7.
4. Морозов И.С., Петров В.И., Сергеева С.А. Фармакология адамантанов. — Волгоград: Волгоградская медицинская академия; 2001. — 320 с. [Morozov IS, Petrov VI, Sergeeva SA. Pharmacology of adamantans. Volgograd: Volgograd Medical Academy; 2001. (In Russ).].
5. Salimov RM, Kovalev GI. Effect of atomoxetine on behavior of outbred mice in the enrichment discrimination test. *Journal of behavioral and brain science*. 2013;3(02):210–216. DOI: 10.4236/jbbs.2013.32022.
6. Ковалёв Г.И., Салимов Р.М., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В. Нейрорецепторный профиль и поведение субпопуляций мышей CD-1, различающихся устойчивостью внимания. *Нейрохимия*. 2020;37(1):15–23. [Kovalev GI, Salimov RM, Sukhorukova NA, Kondrakhin EA, Vasil'eva EV. Neuroreceptor profile and behavior of CD-1 mice subpopulations with different attention stability. *Neurochemical Journal*. 2020;37(1):15–23. (In Russ).]. DOI: 10.31857/S1027813320010148.
7. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М. Влияние пантиама и атомоксетина на устойчивость внимания и распределение дофаминовых D₂ и ГАМК_B-рецепторов у мышей с моделью дефицита внимания. *Биомедицинская химия*.

- 2021;67(5):402–410. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Vasil'eva EV, Kondrakhin EA, Salimov RM. Influence of pantogam and atomoxetine on attention stability and distribution of dopamine D₂ and GABA_B receptors in the attention deficit mouse model. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2021;67(5):402–410. (In Russ).]. DOI: 10.18097/PBMC20216705402.
8. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М. Анализ поведенческих и нейрорецепторных эффектов атомоксетина и фенибута у мышей CD-1 с различной устойчивостью внимания. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(4):3–11. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Vasil'eva EV, Kondrakhin EA, Salimov RM. Analysis of behavioral and neuroceptor effects of atomoxetine and phenibut in CD-1 mice subpopulations diverging in sustained attention. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2021;84(4):3–11. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-4-3-11.
9. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Салимов Р.М. Влияние пирacetama на рецепторные системы мозга мышей CD-1 с разным фенотипом устойчивости внимания. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021; 55(8):10–14. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Kondrakhin EA, Vasil'eva EV, Salimov RM. Influence of piracetam on the brain receptors in CD-1 mice with different attention stability phenotypes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55(8):10–14. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-10-14.
10. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Салимов Р.М. Субхроническое введение семакса повышает устойчивость внимания у мышей CD-1 через модуляцию D₂-дофаминовых рецепторов префронтальной коры мозга. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(6):3–10. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Kondrakhin EA, Vasil'eva EV, Salimov RM. Subchronic administration of semax increases attention stability in CD-1 mice via modulation D₂-dopamine receptors in the prefrontal cortex. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2021;84(6):3–10. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-6-3-10.

Ноопепт защищает инфузории *Paramecium caudatum* от токсического действия соединений тяжёлых металлов

Карпущина О. В.^{1,2}, Поварнина П. Ю.³, Иноземцев А. Н.¹

¹ – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

² – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

³ – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аннотация. Актуальность. Дипептидный препарат Ноопепт, созданный в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, обладает широким спектром фармакологического действия, включая цитопротекторное. В связи с увеличивающимся загрязнением окружающей среды актуальным является выявление защитных свойств препаратов при действии на организм соединений тяжёлых металлов. Целью настоящего исследования было изучение цитопротекторных эффектов Ноопепта в условиях токсичности, индуцированной соединениями тяжёлых металлов, с использованием инфузорий *Paramecium caudatum* в качестве тест-объекта. Методы. Инфузории *Paramecium caudatum* подвергались действию 4 солей тяжёлых металлов: хлорида кадмия, ацетата свинца, сульфата меди, сульфата цинка, а также наночастиц оксида меди и оксида цинка. За 30 мин до внесения повреждающих агентов в среду с опытными клетками добавлялся Ноопепт в концентрациях 0,01–10 мкМ. Результаты. Установлено, что присутствие солей металлов в среде достоверно снижало численность клеток *Paramecium caudatum* в зависимости от времени воздействия. Ноопепт во всех изученных концентрациях снижал гибель клеток, при этом максимальная выраженность эффекта наблюдалась в концентрации 1 мкМ. Заключение. Полученные в настоящей работе данные о способности препарата Ноопепт предотвращать негативные последствия действия соединений тяжёлых металлов позволяют дополнить сведения о широком спектре действия препарата.

Ключевые слова: Ноопепт; тяжёлые металлы; наночастицы; окислительный стресс; *Paramecium caudatum*

Для цитирования:

Карпущина О. В., Поварнина П. Ю., Иноземцев А. Н. Ноопепт защищает инфузории *Paramecium caudatum* от токсического действия соединений тяжёлых металлов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1):9–13. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-9-13>

Поступила: 24 февраля 2022 г. Принята: 02 марта 2022 г. Опубликовано: 30 марта 2022 г..

Noopept protects ciliates *Paramecium caudatum* cells from the toxic effects of heavy metal compounds

Karpukhina OV^{1,2}, Povarnina PYu³, Inozemtsev AN¹

¹ – Federal State Educational Institution of Higher Professional Education Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² – N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ – FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russia

Abstract. Background. The dipeptide drug Noopept, created at the Zakusov Institute of Pharmacology, has a wide range of pharmacological actions, including cytoprotective one. In connection with the increasing pollution of the environment, it is urgent to identify the protective properties of drugs with a negative effect of heavy metal compounds on the live system. The aim of the present study was to investigate the cytoprotective effects of Noopept under toxicity induced by heavy metal compounds using ciliates *Paramecium caudatum* as a test object. Methods. The ciliates *Paramecium caudatum* were exposed to 4 salts of heavy metals: cadmium chloride, lead acetate, copper sulfate, zinc sulfate, as well as nanoparticles of copper oxide and zinc oxide. Noopept was added to the medium with the experimental cells 30 min before the introduction of damaging agents, at concentrations of 0.01–10 μM. Results. It was found that the presence of metal salts in the medium significantly reduced the number *Paramecium caudatum* cells, depending on the time of exposure. Noopept at all studied concentrations reduced cell death, while the maximum intensity of the effect was observed at a concentration of 1 μM. Conclusions. The results obtained make it possible to supplement data on the wide spectrum of Noopept's action.

Keywords: Noopept; heavy metals; nanoparticles; oxidative stress; *Paramecium caudatum*

For citations:

Karpukhina OV, Povarnina PYu, Inozemtsev AN. Noopept protects ciliates *Paramecium caudatum* cells from the toxic effects of heavy metal compounds. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):9–13. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-9-13>

Received: February 24, 2021. Accepted: March 02, 2022. Published: March 30, 2022

Введение / Introduction

Препарат Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) был создан в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в качестве дипептидного аналога классического ноотропа Пирацетама [1–3]. Ноопепт прочно занял место в отечественной (<https://noopept.ru/>) и зарубежной фармакотерапии (международные названия Omberacetam, GVS-111) когнитивных расстройств, тем не менее, изучение функциональных

особенностей этого дипептида в настоящее время продолжается [4–6]. Обнаружен широкий спектр фармакологических и нейрхимических эффектов Ноопепта [7].

Данные о цитопротекторных свойствах Ноопепта при воздействии химических агентов были получены на нейрональных культурах различного типа: нейроноподобных клетках SH-SY5Y [8], культуре PC12 [9], гиппокампальных нейронах линии HT-22 [10] и др. Так, на культуре фетальных тканей коры мозга плода

человека показано, что Ноопепт предотвращает повреждение клеток в условиях окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 или $FeSO_4$ [11]. На клеточной модели болезни Альцгеймера установлено [9], что пептид подавляет образование свободных радикалов, накопление внеклеточного кальция и снижает выраженность раннего и позднего апоптоза.

Клетки простейших эукариотов широко используются в качестве тест-объекта для изучения фармакологических эффектов соединений [12–14]. В частности, инфузории могут иметь рецепторы и сенсорные структуры, функционально похожие на аналогичные рецепторы высших организмов [12, 15]. В настоящее время проводятся многочисленные исследования по выявлению терапевтического потенциала препаратов в условиях окислительного стресса, вызванного соединениями тяжёлых металлов, распространение которых в окружающей среде приобретает угрожающие масштабы [16, 17].

Поскольку известно, что Ноопепт уменьшает негативные проявления окислительного стресса [9, 11], целью данного исследования являлось определение возможного протективного действия Ноопепта на клетки *Paramecium caudatum*, подвергшихся токсическому воздействию соединений тяжёлых металлов.

Материалы и методы / Materials and methods

Работа выполнена на одноклеточных инфузориях *Paramecium caudatum*. Клетки парамеций культивировали на среде Лозина–Лозинского при температуре 22 ± 1 °C в стеклянных колбах объёмом 300 мл с добавлением питательного раствора, содержащего дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (1 мг/мл), и ежедневной частичной заменой части среды, pH = 6,8–7,0.

Для опытов отбирались крупные клетки, находящиеся в начале стационарной фазы роста. Оценивалось действие на клетки 4 солей тяжёлых металлов (ТМ) в конечной концентрации 10 мг/л: хлорида кадмия, ацетата свинца, сульфата меди, сульфата цинка, и защитный эффект Ноопепта в концентрациях 10 мкМ; 1 мкМ; 0,1 мкМ; 0,01 мкМ. Дополнительно изучалось влияние на парамеции наночастиц (НЧ) оксида меди и оксида цинка и эффект Ноопепта в условиях этого влияния. Наночастицы ZnO (40–100 нм) и CuO (20–80 нм) были получены сотрудниками лаборатории физического моделирования двухфазных течений (Объединённый институт высоких температур РАН) методом лазерной абляции металлических мишеней, помещённых в различные жидкости [18, 19]. Нами для опытов в ультразвуковом диспергаторе ULTRA-TURRAX® Tube Drive готовилась суспензия наночастиц (0,1 мг/л) на основе физиологического раствора и дистиллированной воды (pH = 7).

За 30 мин до внесения наночастиц и солей ТМ в среду с опытными клетками добавлялся Ноопепт.

Длительность инкубирования клеток в среде, содержащей частицы ТМ, составляла до 30 ч при такой же температуре 22 ± 2 °C. На всех этапах эксперимента с помощью pH-метра контроллера Kelilong PH-221 измеряли pH среды. Регистрировали численность клеток, характер и скорость движения инфузорий, особенности морфологических изменений клеток.

Численность клеток в 10 мл опытного раствора определяли с использованием микроскопа (2,5 ×, 40 ×, 63 ×) и цифровой камеры Levenhuk C310, 3.1 Mpixel, USB 2.0. Число клеток в 10 мл среды, содержащей интактную культуру инфузорий, служило контролем во всех опытах.

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft. Inc., США). После проверки распределения на нормальность значимость различий между экспериментальными группами оценивали с помощью t критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные на рисунках представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Присутствие солей металлов Cd^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} в среде достоверно снижало численность клеток *Paramecium caudatum* в зависимости от времени воздействия химического агента (рис. 1) Возможным объяснением гибели клеток является нарушение мембранного транспорта, что приводило к отмечаемому в опыте повреждению клеточных органелл и цитоскелета клеток.

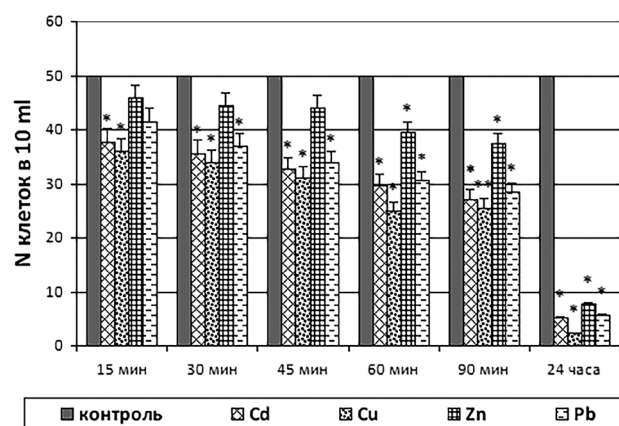


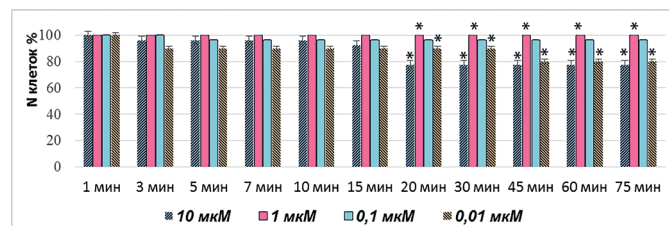
Рис. 1. Токсическое влияние солей тяжёлых металлов на жизнеспособность клеток *Paramecium caudatum*
Fig. 1. Toxic effect of heavy metal salts on cell viability *Paramecium caudatum* cells

Примечания: на оси абсцисс показана длительность воздействия тяжёлых металлов; на оси ординат: N – число особей в 10 мл опытной среды; * – $p < 0,05$ относительно интактных клеток.

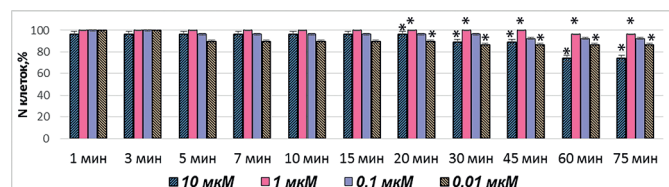
Notes: the abscissa axis shows the duration of exposure to heavy metals; on the ordinate axis: N – the number of individuals in 10 ml of the experimental medium; * – $p < 0.05$ relative to intact cells.

Ноопепт статистически значимо защищал парамеции от гибели. Выраженность эффекта Ноопепта зависела от его концентрации, в концентрации 1 мкМ Ноопепт оказывал наиболее выраженную защиту *Paramecium caudatum* от негативного воздействия солей тяжёлых металлов (рис. 2, а–г).

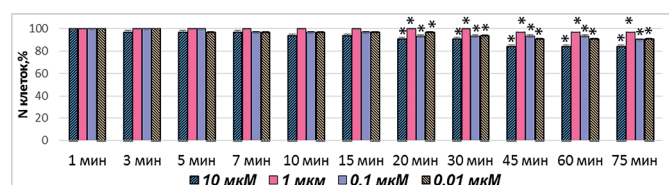
Установлено, что токсический эффект соединений меди и цинка зависит от размера частиц. Внесение в среду коллоидного раствора наночастиц CuO и ZnO оказывало большее негативное воздействие на клетки



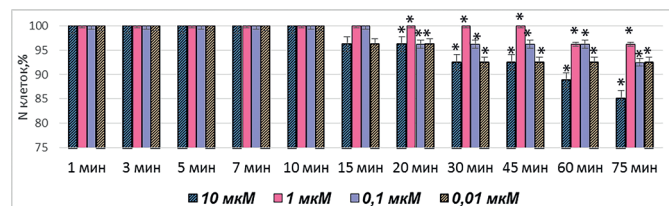
а



б



в



г

Рис. 2. Эффект Ноопепта (0,01 мкМ – 10 мкМ) на численность клеток *Paramecium caudatum* в присутствии в среде солей тяжёлых металлов: а) хлорида кадмия; б) сульфата меди; в) ацетата свинца; г) сульфата цинка

Fig. 2. The effect of Noopept (0.01 мкМ – 10 мкМ) on the number of *Paramecium caudatum* cells in the presence of heavy metal salts in the medium: а) cadmium chloride; б) copper sulfate; в) lead acetate; г) zinc sulfate

Примечания: на оси абсцисс показана длительность воздействия тяжёлых металлов; на оси ординат: N – число особей в процентах относительно исходного количества клеток; * – $p < 0,05$ относительно активного контроля (повреждение солями тяжёлых металлов).

Notes: the abscissa axis shows the duration of exposure to heavy metals; on the ordinate axis: N – the number of individuals as a percentage relative to the initial number of cells; * – $p < 0.05$ relative to active control (damage by heavy metal salts).

Paramecium caudatum, чем эффект присутствия в растворе солей этих металлов. Инфузории *Paramecium caudatum* реагируют на влияние НЧ меди и цинка целым комплексом физиологических и морфологических изменений: реверсией ресничной активности, снижением и полной остановкой скорости движения, разбуханием цитозоля и разрывом мембран.

Ранее нами было показано [20], что негативное влияние солей тяжёлых металлов на цитоплазматическую мембрану клеток парамеций, можно было оценить следующим образом: $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. В результате поставленного эксперимента с наночастицами оксидов меди и цинка, нами определено, что НЧ ZnO были значительно более токсичными для инфузорий, чем НЧ CuO (рис. 3).

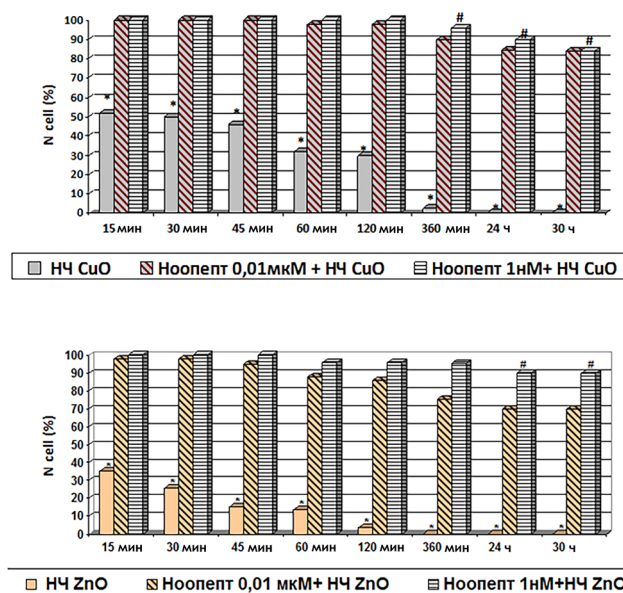


Рис. 3. Влияние Ноопепта (в концентрациях 10^{-8} и 10^{-9} М) на выживаемость клеток, подвергшихся экспозиции наночастиц CuO и ZnO

Fig. 3. The effect of Noopept (in concentrations of 10^{-8} и 10^{-9} M) on the survival of cells exposed to CuO and ZnO nanoparticles

Примечания: на оси абсцисс показана длительность воздействия тяжёлых металлов; на оси ординат: N – число особей в процентах относительно исходного количества клеток; * – $p < 0,05$ относительно интактных клеток; # – $p < 0,05$ относительно активного контроля (повреждение наночастицами CuO и ZnO).

Notes: the abscissa axis shows the duration of exposure to heavy metals; on the ordinate axis: N – the number of individuals as a percentage relative to the initial number of cells; * – $p < 0.05$ relative to intact cells; # – $p < 0.05$ relative to active control (damage by CuO and ZnO nanoparticles).

Ноопепт оказывал цитопротекторное действие и в отношении парамеций, находящихся в среде с наночастицами тяжёлых металлов. В проведённых исследованиях с коллоидными растворами НЧ CuO и НЧ ZnO установлено, что защита клеток парамеций дипептидом намного эффективнее, чем в опытах с сульфатами меди и цинка. При этом также отмечалось

дозозависимое влияние Ноопепта с наибольшим эффектом в конечных концентрациях 0,01 мкМ и 1 нМ (см. рис. 3).

Заклучение / Conclusion

Полученные в настоящей работе данные о способности препарата Ноопепт предотвращать негативные последствия действия соединений тяжёлых металлов позволяют дополнить сведения о широком спектре действия препарата.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121032500080-8).

Financing. The research was carried out within the framework of the scientific project of the state assignment of the Lomonosov Moscow State University (topic No. 121032500080-8).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Карпукхина Ольга Вячеславовна

e-mail: karpukhina.msu@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7271-4008>

SPIN-код: 6762-7087

к. б. н., в. н. с. кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ФИЦ ХФ РАН, Москва, Россия

Karpukhina Olga V.

e-mail: karpukhina.msu@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7271-4008>

SPIN code: 6762-7087

PhD Biological Sci., Leading researcher, Department of higher nervous activity, Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University; FRCCP RAS, Moscow, Russia

Поварнина Полина Юрьевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: povarnina@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN-код: 5498-6724

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

Povarnina Polina Yu.

Corresponding author

e-mail: povarnina@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN code: 5498-6724

PhD Biological Sci., Senior research scientist of the Laboratory of peptide bioregulators of the Department of medicinal chemistry FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Иноземцев Анатолий Николаевич

e-mail: a_inozemtsev@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5059-3241>

SPIN-код: 7119-9015

д. б. н., в. н. с. кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Inozemtsev Anatoli N.

e-mail: a_inozemtsev@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5059-3241>

SPIN code: 7119-9015

Dr. Sci. (Biol.), Leading researcher, Department of higher nervous activity, Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Gudasheva TA, Voronina TA, Ostrovskaya RU et al. Synthesis and anti-amnesic activity of a series of N-acylprolyl-containing dipeptides. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1996;31(1996):151–157. DOI: 10.1016/0223-5234(96)80448-X.

2. Патент РФ на изобретение №2119496/ 27.09.98. Бюл. №27. Серединин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. и др. Производные N-ацилпролилдипептидов. [Patent RUS №2119496/ 27.09.98. Byul. №27/ Seredenin SB, Voronina TA, Gudasheva TA et al. Proizvodnie N-acylprolyldipeptidov. (In Russ).]. Доступно по: <http://allpatents.ru/patent/2119496.html>. Ссылка активна на 01.11.2021.

3. Seredenin SB, Voronina TA, Gudasheva TA et al., inventors; Saegis Pharmaceuticals Inc., assignee. Biologically active n-acylprolyldipeptides having anti-amnesic, antihypoxic and anorexigenic effects. United States patent US. 1995 Aug 8.

4. Зайнуллина Л.Ф., Иванова Т.А., Садовников С.В. и др. Ноотропное средство Ноопепт активирует транскрипционный фактор HIF-1. Доклады Российской академии наук. *Науки о жизни*. 2020;494(1):527–531. DOI: 10.31857/S2686738920050248. [Zainullina LF, Ivanova TV, Sadovnikov SV et al. Cognitive Enhancer Noopept Activates Transcription Factor HIF-1. *Dokl Biochem Biophys*. 2020;494(1):256–260. (In Russ).]. DOI:10.1134/S1607672920050129.

5. Пивоваров А.С., Мурзина Г.Б., Васильева Н.В. Влияния Ноопепта и пирacetama на депрессию вызванного ацетилхолином тока в командных нейронах виноградной улитки. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2020;70(1):125–132. [Influence of Noopept and piracetam on acetylcholin-induced input current in helix lucorum neurons. *I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2020;70(1):125–132. (In Russ).]. DOI: 10.31857/S00444672001013X.

6. Островская Р.У., Ягубова С.С., Жанатаев А.К. и др. Нейропротективный дипептид Ноопепт предотвращает повреждения ДНК на

модели предиабета у мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;168(8):185–190. [Ostrovskaya RU, Yagubova SS, Zhanataev AK et al. Neuroprotective dipeptide noopept prevents DNA damage in mice with modeled prediabetes. *Bull Exp Biol Med*. 2019;168(8):185–190 (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-019-04681-z.

7. Островская Р.У., Гудашева Т.А. Дипептидный препарат Ноопепт: дизайн, фармакологические свойства и механизм действия. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(2):41–52. [Ostrovskaya RU, Gudasheva TA. Dipeptide drug noopept: design, pharmacological properties and mechanism of action. *Ekspperimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2021;84(2):41–52. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-2-41-52.

8. Jia X, Gharibyan AL, Öhman A et al. Neuroprotective and nootropic drug noopept rescues α -synuclein amyloid cytotoxicity. *J Mol Biol*. 2011;414(5):699–712. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.09.044.

9. Ostrovskaya RU, Vakhitova YV, Kuzmina US et al. Neuroprotective effect of novel cognitive enhancer noopept on AD-related cellular model involves the attenuation of apoptosis and tau hyperphosphorylation. *J Biomed Sci*. 2014;21(1):74. DOI: 10.1186/s12929-014-0074-2.

10. Антипова Т.А., Николаев С.В., Островская Р.У. и др. Дипептидный аналог Пирацетама Ноопепт увеличивает жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии HT-22 на модели глутаматной токсичности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016;161(1):68–71. [Antipova TA, Nikolaev SV, Ostrovskaya PU et al. Dipeptide Piracetam analogue Noopept improves viability of hippocampal HT-22 neurons in the glutamate toxicity model. *Bull Exp Biol Med*. 2016;161(1):68–71 (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-016-3344-z.

11. Pelsman A, Hoyo-Vadillo C, Gudasheva TA et al. GVS-111 prevents oxidative damage and apoptosis in normal and Down's syndrome human cortical neurons. *Int J Dev Neurosci*. 2003;21(3):117–124. DOI: 10.1016/s0736-5748(03)00031-5.

12. Rodgers LF, Markle KL, Hennessey TM. Responses of the ciliates tetrahymena and paramecium to vertebrate odorants and tastants. *J Eukaryot Microbiol*. 2008;55(1):27–33. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2007.00300.x.

13. Ramoino P, Candiani S, Pittaluga AM, et al. Pharmacological characterization of NMDA-like receptors in the single-celled organism *Paramecium primaurelia*. *J Exp Biol*. 2014;217(Pt 3):463–471. DOI: 10.1242/jeb.093914.

14. Van Houten J. *Paramecium Biology*. *Results Probl Cell Differ*. 2019;68:291–318. DOI: 10.1007/978-3-030-23459-1_13.

15. Ladenburger EM, Korn I, Kasielke N et al. An Ins(1,4,5)P₃ receptor in *Paramecium* is associated with the osmoregulatory system. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 17):3705–3717. DOI: 10.1242/jcs.03075.

16. Flora SJ, Shrivastava R, Mittal M. Chemistry and pharmacological properties of some natural and synthetic antioxidants for heavy metal toxicity. *Curr Med Chem*. 2013;20(36):4540–4574. DOI: 10.2174/09298673113209990146.

17. Saso L, Gürer-Orhan H, Stepanić V. Modulators of oxidative stress: chemical and pharmacological aspects. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(8):657. DOI: 10.3390/antiox9080657.

18. Karpuhin VT, Malikov MM, Borodina TI, Val'ano GE, Gololobova OA. Investigation of the characteristics of a colloidal solution and its solid phase obtained through ablation of zinc in water by high-power radiation from a copper vapor laser. *Thermophysical Properties of Materials*. 2011;49(5):679–684. DOI: 10.1134/S0018151X11050099.

19. Карпухин В.Т., Маликов М.М., Бородин Т.И., Вальяно Г.Е., Гололобова О.А. Синтез слоистого органо-неорганического нанокompозита меди методом лазерной абляции в жидкости. *Теплофизика высоких температур*. 2013;51(2):311–314. [Karpuhin VT, Malikov MM, Borodina TI, Val'ano GE, Gololobova OA. Sintez sloistogo organo-neorganicheskogo nanokompozita medi metodom lazernoj ablyacii v zhidkosti. *High Temperature*. 2013;51(2):311–314. (In Russ).].

20. Morgunov IG, Karpukhina OV, Kamzolova SV et al. Investigation of the effect of biologically active threo-Ds-isocitric acid on oxidative stress in *Paramecium caudatum*. *Prep Biochem Biotechnol*. 2018;48(1):1–5. DOI: 10.1080/10826068.2017.1381622.

Влияние комбинированного применения мексидола с диклофенаком натрия на выраженность экссудативного воспаления у крыс при превентивном десятидневном пероральном введении

Иванова Е. А., Васильчук А. Г., Матюшкин А. И., Воронина Т. А.

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

Аннотация. На модели каррагенанового отёка лапы у крыс установлено, что диклофенак натрия при 10-дневном превентивном пероральном введении (один раз в сутки) значительно снижает выраженность экссудации в дозе 10 мг/кг, но не влияет в дозе 5 мг/кг. При применении мексидола в дозе 100 мг/кг в комбинации с диклофенаком натрия в дозе 5 мг/кг (превентивно, перорально, 10 дней, один раз в сутки) значимое снижение отёка лапы по сравнению с контрольной группой наблюдается на протяжении первых двух из четырёх часов его регистрации. Однако 10-дневное превентивное пероральное введение мексидола в дозе 100 мг/кг (один раз в сутки) вызывает усиление выраженности каррагенанового отёка лапы крыс через четыре часа после введения флоггена.

Ключевые слова: воспаление; каррагенановый отёк; диклофенак натрия; мексидол; крысы

Для цитирования:

Иванова Е.А., Васильчук А.Г., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. Влияние комбинированного применения мексидола с диклофенаком натрия на выраженность экссудативного воспаления у крыс при превентивном десятидневном пероральном введении. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1):14–19. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-14-19>

Поступила: 24 февраля 2022 г. **Принята:** 02 марта 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

Effect of the combination of mexidol and diclofenac sodium on exudative inflammation in rats after ten-day preventive oral administration

Ivanova EA, Vasilchuk AG, Matyushkin AI, Voronina TA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. In rats with carrageenan-induced paw edema, diclofenac sodium significantly reduces exudation after ten-day preventive oral administration at a dose of 10 mg/kg but not 5 mg/kg. Mexidol at a dose of 100 mg/kg in combination with diclofenac sodium at a dose of 5 mg/kg (preventively orally, during 10 days, once a day) reduces paw edema during the first two out of four hours of its recording compared with the control group. However, ten-day preventive oral administration of mexidol at a dose of 100 mg/kg (once a day) increases the severity of carrageenan-induced paw edema in rats at four hours after the injection of the phlogogen.

Keywords: inflammation; carrageenan-induced edema; diclofenac sodium; mexidol; rats

For citations:

Ivanova EA, Vasilchuk AG, Matyushkin AI, Voronina TA. Effect of the combination of mexidol and diclofenac sodium on exudative inflammation in rats after ten-day preventive oral administration. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):14–19. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-14-19>

Received: February 24, 2021. **Accepted:** March 02, 2022. **Published:** March 30, 2022

Введение / Introduction

Мексидол – разработанное в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» антиоксидантное средство, оказывающее мембранопротекторное и антигипоксическое действие [1, 2] и применяемое в комплексной терапии цереброваскулярных, сердечно-сосудистых заболеваний, болезней нервной системы, открытоугольной глаукомы и других заболеваний [3]. В экспериментах на мышах и крысах установлено, что мексидол при однократном введении в комбинации с нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) как неселективным ингибитором циклооксигеназы (ЦОГ) диклофенаком натрия, так и селективным ингибитором ЦОГ-2 эторикоксибом усиливает анти-экссудативное действие НПВП [4, 5]. Однако мексидол *per se* при однократном введении в дозах 50, 100 и

200 мг/кг (внутрибрюшинно) [6] и 25 мг/кг (перорально) [4] не оказывает значимого влияния на выраженность острого экссудативного воспаления.

При воспалении интенсифицируется перекисное окисление липидов, и окисление липопротеинов низкой плотности приводит к образованию иммуногенных и провоспалительных окисленных липидов и липопротеинов [7].

Целью данной работы является изучение влияния мексидола *per se* и в комбинации с неселективным ингибитором ЦОГ диклофенаком натрия при превентивном 10-дневном пероральном введении на модели каррагенанового отёка лапы у крыс. Эта методика является моделью экссудативного воспаления, сопровождающегося значительным повышением в повреждённых тканях экспрессии ЦОГ-2 [8] и концентрации продуктов свободнорадикального окисления липидов [9–11].

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. В работе использовали половозрелых аутбредных белых крыс-самцов массой 240–280 г, полученных из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская область). Организацию и проведение работ осуществляли 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. Правила оборудования помещений и организации процедур», Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, и правилами, утверждёнными этической комиссией НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Каждая группа животных включала на начало исследования 10 крыс.

Объекты исследования. Диклофенак натрия («Немофарм», Сербия) применяли в дозах 5 и 10 мг/кг; мексидол (ООО «НПК «ФАРМАСОФТ», Россия) — в дозе 100 мг/кг; использовали комбинацию диклофенака натрия в дозе 5 мг/кг и мексидола в дозе 100 мг/кг; растворителем служил физиологический раствор (ОАО НПК «ЭСКОМ», Россия). Изучаемые препараты, их комбинацию (сначала крысам вводили диклофенак натрия, затем через 30 минут мексидол) и физиологический раствор (контрольной группе) вводили перорально в течение 10 суток, последнее введение препаратов осуществляли за 1 час до интраплатантарного введения раствора каррагенана.

Каррагенановый отёк лапы у крыс вызывали субплатантарным введением 0,1 мл 1 % раствора каррагенана (Sigma-Aldrich, США) в заднюю лапу животных [12]. Отёк лапы регистрировали по разнице диаметра лапы в области плюсны, измеренного штангенциркулем (мм) через 1, 2, 3 и 4 ч после индукции воспаления относительно диаметра до введения раствора каррагенана. По полученным данным методом трапеций вычисляли площадь под кривой зависимости изменения диаметра лап животных от времени (мм²). Кроме того, на протяжении опыта регистрировали массу тела крыс и гибель животных.

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 10.0. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. В случае нормального распределения в экспериментальных группах и соблюдения межгруппового равенства дисперсий дальнейшую обработку проводили с помощью критерия множественных сравнений Ньюмена–Кейлса и t-критерия Стьюдента (при сравнении только с контрольной группой). При отсутствии нормального распределения в экспериментальных группах либо при несоблюдении межгруппового равенства дис-

персий дальнейшую обработку проводили с помощью рангового критерия Краскела–Уоллиса с последующим сравнением выборок с использованием критерия Данна и с помощью критерия Манна–Уитни (при сравнении только с контрольной группой). Результаты в таблице 1 представлены в зависимости от использования параметрических или непараметрических методов анализа: в случае применения параметрической статистики как среднее $\pm$ ошибка среднего (стандартное отклонение) — Mean $\pm$ SEM (SD); в случае анализа непараметрическими методами как медиана, первый и третий квартиль — Mediana (Q1; Q3). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Воспалительная реакция в ответ на введение 1 % раствора каррагенана у животных контрольной группы характеризовалась нарастанием отёка лапы в течение 3 часов после введения флогогена, снижаясь к 4-му часу наблюдения. Согласно статистическому анализу данных с использованием методов множественных сравнений, изучаемые препараты значимо не снижали выраженность экссудативной реакции животных. Вместе с тем, если при введении диклофенака натрия в дозе 5 мг/кг не выявлено его значимого влияния на экссудацию и при парном сравнении с контрольной группой с помощью критерия Манна–Уитни или t-критерия Стьюдента (в зависимости от распределения в выборках и соблюдения равенства дисперсий), то при введении этого НПВП в дозе 10 мг/кг или в комбинации с мексидолом зарегистрированы значимые различия при парном сравнении с контрольной группой. Так, диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг снижал выраженность отёка лапы у крыс на 47,1; 52,2 и 37,9 %, соответственно, через 1, 2 и 3 часа после индукции воспаления при снижении площади под кривой на 39,9 %. Мексидол в дозе 100 мг/кг в сочетании с диклофенаком натрия в дозе 5 мг/кг усиливал эффект НПВП. По сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни) комбинация препаратов значимо подавляла экссудацию через 1 и 2 часа после введения флогогена на 58,8 и 47,8 % при уменьшении площади под кривой на 26,5 % (табл. 1). Однако усиление антиэкссудативного эффекта, наблюдаемое после 10-дневного перорального введения комбинации НПВП в дозе 5 мг/кг и мексидола в дозе 100 мг/кг, было менее выраженным, чем после однократного внутрибрюшинного комбинированного введения препаратов в этих дозах. Эффект комбинации диклофенака натрия в дозе 5 мг/кг и мексидола в дозе 100 мг/кг (однократно, внутрибрюшинно) был значимо выше (через 2 и 3 часа после введения флогогена) эффекта диклофенака натрия в дозе 5 мг/кг (однократно, внутрибрюшинно) [5].

У мексидола при ежедневном 10-дневном пероральном введении в дозе 100 мг/кг выявлена способность усиливать экссудативную реакцию крыс через 4 часа после введения раствора каррагенана ($p = 0,058$

по сравнению с контрольной группой, t -критерий Стьюдента; $p < 0,05$, критерий Ньюмена–Кейлса). Ранее парадоксальный прооксидантный эффект препарата был зарегистрирован в системе фотоиндуцированного гемолиза, механизм которого связывают с влиянием мексидола на антиоксидантную систему эритроцита, а именно с его ингибирующим действием на фосфолипазу A2, которая в тандеме с глутатионпероксидазой-1 образует основную систему обезвреживания пероксидов липидов в мембране эритроцитов [13]. Известно, что при экспериментальном панкреатите у собак мексидол проявляет цитопротекторное действие, в том числе за счёт снижения активности фосфолипазы A2 [14]. Ингибированием мексидолом активности фосфолипазы A2 можно объяснить и усиление противовоспалительного эффекта НПВП при их комбинированном применении, так как это приводит к снижению образования из фосфолипидов субстрата ЦОГ арахидоновой кислоты и, следовательно, провоспалительных простагландинов.

Ежедневное пероральное введение диклофенака натрия в дозе 10 мг/кг приводило к снижению массы тела крыс и к их гибели. Прирост массы тела живот-

ных этой группы был отрицательным на протяжении всего опыта: на 4-е сутки введения препарата медиана изменения массы тела относительно её значения до 1 введения диклофенака составляла –(минус) 2,5 г; на 10-е сутки введения масса тела крыс снизилась на 50 г по сравнению со значением в 1 сутки опыта (табл. 2). На протяжении 10 дней введения диклофенака натрия в дозе 10 мг/кг зарегистрирована гибель 4 из 10 животных в группе, в других группах гибели не было. Однако если на 4-е сутки введения мексидола в дозе 100 мг/кг, диклофенака в дозе 5 мг/кг и их комбинации значимой разницы в наборе массы тела крысами по сравнению с контрольной группой не наблюдалось, то на 10-е сутки зарегистрирован сниженный прирост массы тела у крыс, которым вводили комбинацию препаратов. По сравнению с 1 днём регистрации масса тела животных этой группы уменьшилась на 6 г (см. табл. 2).

Примечательно, что вскрытие выведенных из эксперимента по его завершении и погибших крыс не выявило видимых язвенных дефектов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у животных, которым вводили диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг. У крыс этой

Таблица 1

Влияние диклофенака натрия, мексидола и их комбинации при десятидневном пероральном превентивном введении на каррагенановый отёк лапы у крыс

Table 1

Effect of diclofenac sodium, mexidol and their combination on carrageenan-induced paw edema in rats after ten-day preventive oral administration

Группа Group	Изменение диаметра лапы после введения раствора каррагенана, мм: Change in paw diameter after injection of carrageenan solution, mm:				Площадь под кривой, мм ² Area under the curve, mm ²
	1 час hour 1	2 час hour 2	3 час hour 3	4 час hour 4	
Контроль Control	0,85 (0,65; 1,05)	1,15 (0,95; 1,35)	1,40±0,12 (0,35)	1,29±0,15 (0,42)	3,58 (3,25; 3,93)
Мексидол 100 мг/кг Mexidol 100 mg/kg	0,70 (0,60; 0,80)	1,55 (1,10; 1,90)	1,72±0,13 (0,42)	1,74±0,16 (0,50)**	4,50 (3,20; 5,55)
Диклофенак 5 мг/кг Diclofenac 5 mg/kg	0,60 (0,10; 1,00)	1,00 (0,70; 1,60)	1,17±0,19 (0,60)	1,20±0,15 (0,49) [#]	3,25 (1,55; 4,30)
Диклофенак 10 мг/кг Diclofenac 10 mg/kg	0,45 (0,20; 0,50)*	0,55 (0,30; 0,90)**	0,87±0,16 (0,39)**	0,97±0,08 (0,20) [#]	2,15 (1,75; 2,60)**
Диклофенак 5 мг/кг + Мексидол 100 мг/кг Diclofenac 5 mg/kg + Mexidol 100 mg/kg	0,35 (0,30; 0,60)*	0,60 (0,50; 0,90)**	1,28±0,17 (0,53)	1,10±0,11 (0,36) [#]	2,63 (2,00; 3,05)*

Примечания: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Манна–Уитни или t -критерий Стьюдента в случае соответственно отсутствия нормального распределения данных в выборках и/или соблюдения межгруппового равенства дисперсий или наличия нормального распределения данных в выборках и соблюдения межгруппового равенства дисперсий; ** — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Ньюмена–Кейлса; [#] — $p < 0,05$ по сравнению с группой «Мексидол 100 мг/кг», критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по критерию Данна или критерий Ньюмена–Кейлса в случае соответственно отсутствия нормального распределения данных в выборках и/или соблюдения межгруппового равенства дисперсий или наличия нормального распределения данных в выборках и соблюдения межгруппового равенства дисперсий; Данные представлены в случае применения параметрической статистики как среднее ± ошибка среднего (стандартное отклонение); в случае анализа непараметрическими методами — как медиана, первый и третий квартиль.

Notes: * — $p < 0.05$ compared with the control group, Mann–Whitney test (in the case of analysis by nonparametric methods) or Student's t -test (in the case of using parametric statistics); ** — $p < 0.05$ compared with the control group, Newman–Keuls test; [#] — $p < 0.05$ compared with the group "Mexidol 100 mg/kg", Kruskal–Wallis test followed by multiple comparison according to Dunn test (in the case of using nonparametric statistics) or Newman–Keuls test (in the case of using parametric statistics); Data are presented as mean ± error of the mean (standard deviation) in the case of parametric statistics or as the median, first and third quartile in the case of analysis by nonparametric methods.

Таблица 2

Влияние диклофенака натрия, мексидола и их комбинации на массу тела крыс

Table 2

Effect of diclofenac sodium, mexidol and their combination on the body weight in rats

Группа Group	Масса до введения препаратов в 1-й день, г Body weight before dosing on day 1, g	Изменение массы тела относительно значений в 1-й день введения препаратов (до их введения), г Change in body weight relative to day 1 of treatment (before dosing), g	
		4 день day 4	10 день day 10
Контроль Control	256,1±5,1 (16,1)	20,5 (18,0; 32,0) n = 10	27,0 (18,0; 32,0) n = 10
Мексидол 100 мг/кг Mexidol 100 mg/kg	254,2±3,6 (11,5)	24,5 (20,0; 35,0) [#] n = 10	24,0 (11,0; 52,0) [#] n = 10
Диклофенак 5 мг/кг Diclofenac 5 mg/kg	256,7±2,9 (9,2)	21,0 (17,0; 25,0) [#] n = 10	7,0 (-19,0; 13,0) n = 10
Диклофенак 10 мг/кг Diclofenac 10 mg/kg	253,9±4,4 (14,0)	-2,5 (-11,0; 1,0) [*] n = 10	-50,0 (-66,0; -22,0) [*] n = 6
Диклофенак 5 мг/кг + Мексидол 100 мг/кг Mexidol 100 mg/kg + Diclofenac 5 mg/kg	253,5±3,5 (11,9)	11,0 (6,0; 14,0) n = 10	-6,0 (-9,0; 1,0) [*] n = 10

Примечания: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением по критерию Данна; [#] — $p < 0,05$ по сравнению с группой «Диклофенак 10 мг/кг», критерий Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением по критерию Данна; Данные представлены в случае применения параметрической статистики как среднее ± ошибка среднего (стандартное отклонение); в случае анализа непараметрическими методами — как медиана, первый и третий квартиль.

Notes: * — $p < 0.05$ compared with the control group, Kruskal-Wallis test followed by multiple comparison according to Dunn test; [#] — $p < 0.05$ compared with the group “Diclofenac 10 mg/kg”, Kruskal-Wallis test followed by multiple comparison according to Dunn test; Data are presented as mean ± error of the mean (standard deviation) in the case of parametric statistics or as the median, first and third quartile in the case of analysis by nonparametric methods.

группы наблюдались истончение стенок кишечника, вздутие желудка и кишечника, заброс желчи в желудок, и остатки пищи в ЖКТ практически отсутствовали — симптомы развившегося при введении НПВП воспаления ЖКТ. НПВП-ассоциированная энтеропатия, приводящая к хроническому воспалению кишечника, является частым побочным эффектом НПВП; повреждение тощей и подвздошной кишки при НПВП-ассоциированной энтеропатии сопровождается мало-заметной кровопотерей, которая является причиной железодефицитной анемии [15]. По данным клинических исследований, видеокапсульная эндоскопия позволяет выявить эрозии и язвы тонкой кишки у 30–50 % пациентов, на протяжении 2 недель принимавших НПВП неселективные ингибиторы ЦОГ напроксен и ибупрофен [7, 15, 16].

Одним из звеньев патогенеза НПВП-ассоциированной энтеропатии рассматривается повреждение митохондрий клеток слизистой оболочки кишечника с последующим образованием свободных радикалов [17]. Поэтому значимое снижение набора массы тела крысами при введении им диклофенака натрия в дозе

5 мг/кг в сочетании с мексидолом в дозе 100 мг/кг по сравнению с контрольной группой на 10-е сутки опыта, вероятно, свидетельствует об усилении мексидолом негативного влияния НПВП на состояние кишечника.

Закключение / Conclusion

Таким образом, результаты проведённого исследования подтвердили зарегистрированную ранее способность мексидола усиливать противовоспалительный эффект НПВП. Однако при превентивном 10-дневном пероральном введении мексидола в дозе 100 мг/кг в комбинации с диклофенаком натрия в дозе 5 мг/кг усиление противовоспалительного эффекта НПВП не превышает эффект однократного сочетанного введения этих препаратов в тех же дозах. Кроме того, введение мексидола в дозе 100 мг/кг в течение 10 дней приводит к усилению выраженности вызванного каррагенаном экссудативного воспаления у крыс, а также в комбинации с диклофенаком натрия в дозе 5 мг/кг — к снижению прироста массы тела животных. Это является основанием для рекомендации к включению в комбинацию с НПВП для усиления их действия мексидола в меньших дозах.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Иванова Елена Анатольевна**Автор, ответственный за переписку**

e-mail: iwanowaea@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-2051>

SPIN-код: 5005-0337

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

Ivanova Elena A.**Corresponding author**

e-mail: iwanowaea@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-2051>

SPIN code: 5005-0337

PhD Pharm Sci., Senior Research Scientist, Laboratory of psychopharmacology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Васильчук Анастасия Геннадьевна

e-mail: jimlev@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9079-1322>

SPIN-код: 5646-4635

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

Vasilchuk Anastasia G.

e-mail: jimlev@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9079-1322>

SPIN code: 5646-4635

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

Матюшкин Александр Иванович

e-mail: matyushkin.alex@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7640-0551>

SPIN-код: 8157-9580

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

Matyushkin Alexander I.

e-mail: matyushkin.alex@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7640-0551>

SPIN code: 8157-9580

PhD Biological Sci., Junior Research Scientist, Laboratory of psychopharmacology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Воронина Татьяна Александровна

e-mail: voroninata38@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

SPIN-код: 5766-3452

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

Voronina Tatiana A.

e-mail: voroninata38@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7065-469X>

SPIN code: 5766-3452

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

Список литературы / References

1. Открытая база данных: Энциклопедия лекарств [Internet]. Москва (Россия): Регистр лекарственных средств России с 2000 — [cited 2021 oct 17]. Available from: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_679.htm

2. Воронина Т.А. Мексидол: Основные нейropsychotropic эффекты и механизм действия. *Фарматека*. 2009;180(6):35–38. [Voronina TA. Mexidol: main neuropsychotropic effects and mechanisms of action. *Farmateka*. 2009;180(6):35–38. (In Russ).]

3. Воронина Т.А., Иванова Е.А. Комбинированное применение мексидола с известными лекарственными средствами. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019;119(4):115–124. [Voronina TA, Ivanova EA. Combined administration of mexidol with known medicines. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2019;119(4):115–124. (In Russ).]. DOI: 10.17116/jnevro2019119041115.

4. Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Васильчук А.Г., Воронина Т.А. Споспособность мексидола усиливать антиэкссудативное действие диклофенака натрия и эторикоксиба на модели каррагенанового отека у крыс и мышей. *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2021;76(2):61–66. [Ivanova EA, Matyushkin AI, Vasilchuk AG,

Voronina TA. Ability of mexidol to enhance antiexudative effect of diclofenac sodium and etoricoxib in rats and mice with carrageenan-induced edema. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*. 2021;76(2):46–51. (In Russ).].

5. Иванова Е.А., Васильчук А.Г., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. Усиление противовоспалительного и анальгетического эффекта диклофенака натрия при его применении в комбинации с мексидолом в эксперименте на грызунах. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2020;83(7):22–26. [Ivanova EA, Vasilchuk AG, Matyushkin AI, Voronina TA. Enhancement of the anti-inflammatory and analgesic effect of diclofenac sodium in combination with mexidol. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2020;83(7):22–26. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-7-22-26.

6. Васильчук А.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А. Исследование противовоспалительного действия мексидола при однократном внутривенном введении на модели укусного перитонита у мышей. Всероссийская научная конференция молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки»; Ноябрь 8–10, 2018; Рязань. [Vasilchuk AG, Ivanova EA, Voronina TA. Issledovanie protivovospalitel'nogo

deystviya meksidola pri odnokratnom vntribryushinnom vvedenii na modili uksusnogo peritonita u myshey. (Conference proceedings) Vserossiyskaya nauchnaya konferentsiya molodykh uchenykh, posvyashchennoy 95-letiyu so dnya rozhdeniya professora A.A. Nikulina «Dostizheniya sovremennoy farmakologicheskoy nauki»; 2018 nov 8-10; Ryazan'. (In Russ.). URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_36371259_65920083.pdf. Ссылка активна на 17.10.2021.

7. Chang MK, Binder CJ, Miller YI et al. Apoptotic cells with oxidation-specific epitopes are immunogenic and proinflammatory. *J Exp Med*. 2004;200(11):1359–1370. DOI: 10.1084/jem.20031763.

8. Rafiee L, Hajhashemi V, Javanmard SH. Maprotiline inhibits COX2 and iNOS gene expression in lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages and carrageenan-induced paw edema in rats. *Cent Eur J Immunol*. 2019;44(1):15–22. DOI:10.5114/ceji.2019.84011.

9. Kuedo Z, Sangsuriyawong A, Klaypradit W, Tipmanee V, Chonpathompikunlert P. Effects of astaxanthin from *Litopenaeus vannamei* on carrageenan-induced edema and pain behavior in mice. *Molecules*. 2016;21(3):382. DOI:10.3390/molecules21030382.

10. Abd-Allah AAM, El-Deen NAMN, Mohamed WAM, Naguib FM. Mast cells and pro-inflammatory cytokines roles in assessment of grape seeds extract anti-inflammatory activity in rat model of carrageenan-induced paw edema. *J Basic Med Sci*. 2018;21(1):97–107. DOI: 10.22038/jbms.2017.25067.6219.

11. Mitrea DR, Malkey R, Florian TL, et al. Daily oral administration of chlorogenic acid prevents the experimental carrageenan-induced oxidative stress. *J Physiol Pharmacol*. 2020;71(1):55–65. DOI: 10.26402/jpp.2020.1.04

12. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;111:544–547. DOI:10.3181/00379727-111-27849.

13. Галебская Л.В., Соловцова И.Л., Мирошникова Е.Б. и др. Парадоксальный эффект антиоксиданта в системе фотоиндуцированного гемолиза. Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. 2016;11(3):95–102. [Galebskaya LV, Solovtsova IL, Miroshnikova EB et al. Paradoxical effects of antioxidant action in the photohaemolysis system. *Vestnik of Saint Petersburg University. Series 11. Medicine*. 2016;11(3):95–102. (In Russ.). DOI: 10.21638/11701/spbu11.2016.309.

14. Власов А.П., Трофимов В.А., Березин В.А. и др. Модификация обмена липидов при панкреатите под влиянием мексидола. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2003;66(1):40–45. [Vlasov AP, Trofimov VA, Berezin VA et al. Mexidol modifies lipid metabolism in animals with experimental pancreatitis. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2003;66(1):40–45. (In Russ.). DOI: 10.30906/0869-2092-2003-66-1-40-45.

15. Каратеев А.Е., Насонов Е.Л., Ивашкин В.Т. и др. Рациональное использование нестероидных противовоспалительных препаратов. Научно-практическая ревматология. 2018;56(приложение 1):1–29. [Karateev AE, Nasonov EL, Ivashkin VT et al. Rational use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clinical guidelines. Rheumatology Science and Practice*. 2018;56 suppl.1:1–29. (In Russ.). DOI: 10.14412/1995-4484-2018-1-29.

16. Hawkey CJ, Ell C, Simon B et al. Less small-bowel injury with lumiracoxib compared with naproxen plus omeprazole. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(5):536–544. DOI: 10.1016/j.cgh.2007.12.023.

17. Shin S, Noh C, Lim S et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy. *Intest Res*. 2017;15(4):446–455. DOI: 10.5217/ir.2017.15.4.446.

Изучение эффектов диазепама на асцитную карциному Эрлиха и тревожные реакции у мышей самцов популяции SHK

Калинина Т. С.¹, Шимширт А. А.¹, Лисицкая К. В.², Волкова А. В.¹, Кудряшов Н. В.^{1,3}

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

² – Института биохимии имени А.Н. Баха Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

³ – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация. Актуальной проблемой является коморбидность злокачественных опухолей и аффективных расстройств. Известно о неблагоприятном влиянии некоторых психотропных лекарственных средств на злокачественные опухоли и метастазирование, в эксперименте установлена связь нейромедиаторов с опухолями. Известно свойство диазепама стимулировать рост асцитной карциномы Эрлиха в эксперименте на мышах. Целью настоящего исследования явилось изучение роли бензодиазепиновых рецепторных сайтов разной локализации в стимулирующем влиянии диазепама на карциному Эрлиха. При использовании фармакологических анализаторов бензодиазепинового сайта центрального ГАМК_A рецептора флумазенила (5 мг/кг, подкожно) и блокатора митохондриального транспортного белка 18 кДа соединения PK11195 (5 мг/кг, подкожно) были изучены эффекты диазепама (0,03 и 3,0 мг/кг, интрагастрально) на развитие асцитной карциномы Эрлиха и ориентировочно-исследовательскую реакцию в тесте «открытое поле» на мышах самцах популяции SHK. Установлено, что диазепам в дозе 0,03 мг/кг, но не в дозе 3 мг/кг, увеличивает клеточность опухолевого выпота. Вместе с тем, диазепам в обеих изученных дозах вызывает увеличение периферической двигательной активности у мышей, что указывает на усиление тревожных реакций. Установлено, что флумазенил, но не PK11195, ослабляет стимулирующий эффект диазепама на асцитную карциному Эрлиха и ингибирует про-анксиогенное действие малой дозы диазепама. Полученные результаты позволяют сделать вывод об отсутствии ассоциативной связи между проопухолевым действием диазепама и его влиянием на тревожные реакции, но при этом не исключать участие центральных механизмов в стимулирующем эффекте низких доз бензодиазепамина на опухоль.

Ключевые слова: бензодиазепины; ГАМК_A рецептор; карцинома Эрлиха; мышь; тревожные реакции

Для цитирования:

Калинина Т. С., Шимширт А. А., Лисицкая К. В., Волкова А. В., Кудряшов Н. В. Изучение эффектов диазепама на асцитную карциному Эрлиха и тревожные реакции у мышей самцов популяции SHK. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1):20–29. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-20-29>
Поступила: 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 января 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

Study of diazepam effects on Ehrlich ascites carcinoma and anxiety responses in male SHK mice

Kalinina TS¹, Shimshirt AA¹, Lisitskaya KV², Volkova AV¹, Kudryashov NV^{1,3}

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

² – Bach Institute of Biochemistry RAS the Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences Moscow, Russia

³ – Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovskiy University), Moscow, Russia

Abstract. Comorbidity of malignant tumors and affective disorders is an urgent problem. It is known that some psychotropic drugs may adversely influence the growth of malignant tumors and metastasis; in the experiment, a connection between neurotransmitters and tumors was established. Earlier, in experiments on mice, the ability of diazepam to stimulate the growth of Ehrlich's ascites carcinoma was demonstrated. The aim of this study was to assess the role of central and peripheral benzodiazepine receptor sites in the stimulating effect of diazepam on Ehrlich's carcinoma. The effects of diazepam (0.03 and 3.0 mg / kg, intragastric) on the development of Ehrlich's ascites carcinoma and an orientation-exploratory response in the "open field" test on male SHK mice were studied. It was found that diazepam at a dose of 0.03 mg / kg, but not at a dose of 3 mg / kg, increases the cellularity of the malignant ascites. At the same time, diazepam in both doses studied causes an increase in the peripheral motor activity of mice, which indicates an increase in anxiety reactions. It was found that flumazenil, but not PK11195, attenuates the stimulating effect of diazepam on Ehrlich's ascites carcinoma and inhibits the pro-anxiogenic effect of a small dose of diazepam. The results obtained allow us to conclude that there is no associative relationship between the pro-tumor effect of diazepam and its effect on anxiety responses, but at the same time, the participation of central mechanisms in the stimulating effect of benzodiazepine on the tumor cannot be ruled out.

Keywords: benzodiazepines GABAA receptor; Ehrlich carcinoma; mouse; anxiety responses

For citations:

Kalinina TS, Shimshirt AA, Lisitskaya KV, Volkova AV, Kudryashov NV. Study of diazepam effects on Ehrlich ascites carcinoma and anxiety responses in male SHK mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):20–29. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-20-29>
Received: December 01, 2021. **Accepted:** January 15, 2022. **Published:** March 30, 2022

Введение / Introduction

По данным Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer), в 2012 году в мире было зарегистрировано 14,1 млн новых случаев злокачественных заболеваний, рак стал основной причиной смерти в 8,2 млн случаев в 2012 году. При сохранении существующих тенденций заболеваемости к 2030 злокачественные онкологические заболевания достигнут 68 % прироста в сравнении с 2012 годом [1]. Несмотря на существенный прогресс в разработке новых методик хирургического, радиационного лечения и иммунотерапии, а также внедрения эффективных средств таргетной терапии, многие проблемы лечения онкологических больных остаются нерешёнными.

Известно о коморбидности злокачественных опухолей и аффективных расстройств, в частности тревожно-депрессивных [2–4]. Однако вопрос о первичности этих процессов остаётся открытым. Но тем не менее, в последнее время всё больше данных указывают на непосредственную роль нервной системы на течение опухолевого процесса. Через гипоталамо-гипофизарно-адреналовую ось, а также благодаря симпатическому и парасимпатическому влиянию, нервная система, в том числе и её центральные отделы, участвуют в формировании оптимального микроокружения в тканях позвоночных, регулируя гомеостаз и воздействуя на течение многих патологических процессов, в том числе и опухолевых. Полагают, что на тканевом уровне периневральное пространство создаёт для опухолевых клеток микроокружение и антиапоптотические условия, необходимые для их выживания и распространения [5, 6]. Ряд злокачественных опухолей могут реагировать на факторы роста, вырабатываемые нервными волокнами периферических нервов, а также способны вырабатывать аксон-стимулирующие факторы [7]. Подобно неопластическому, при раке предстательной железы, прямой кишки, мочевого пузыря и пищевода наблюдается увеличение количества, протяжённости аксонов и внедрение нервных волокон в опухолевую ткань [8–10]. Ряд опухолей и клеточных линий продуцируют нейротрофические факторы (нейрональный фактор роста, нейротрофический фактор мозга и нейротрофический глиальный фактор), стимулирующие внедрение в ткань опухоли симпатических и парасимпатических нервных волокон [11, 12]. При раке предстательной железы у пациентов наблюдается повышенная плотность нервных окончаний в опухолевых очагах, тогда как *in vitro* показана повышенная выработка РС-3 клетками рака предстательной железы семафорина 4F, молекулы аксонального сигнального наведения [8, 13].

Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что хронический стресс, депрессия, неблагоприятные социальные условия являются существенными факторами риска развития и прогрессирования злокачественных опухолевых процессов [3, 4].

Экспериментальные исследования также выявили существенный вклад стресса в развитие злокачественных процессов. Показано, что иммобилизационный стресс на фоне введения гепатотоксичного канцерогена диэтилнитрозамина повышает инцидентность и скорость роста опухолей печени у крыс [14]. Вынужденное плавание, гипотермия, хирургическое вмешательство, социальный конфликт вызывают 2–5-кратное повышение скорости и количества метастатических очагов в лёгких у крыс, экспериментально зараженных опухолью молочной железы MADB106 [15]. При хроническом стрессе выброс катехоламинов и глюкокортикоидных гормонов угнетает механизмы противоопухолевой активности иммунной системы [16].

Эксперименты на мышах с трансплантируемыми сингенными опухолями выявили, что норадреналин и адреналин ингибируют образование противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов за счёт воздействия на β -адренергические сигнальные механизмы [17]. Положительные психоэмоциональные факторы, такие как социальная поддержка и забота, ассоциируются с повышением уровней NK-киллеров в крови и опухолевом микроокружении, указывая на возможное позитивное влияние положительного когнитивного психологического стимула на функции иммунной системы и её противоопухолевую активность [18]. Стресс запускает выброс катехоламинов, которые стимулируют пролиферацию опухолевых клеток и усиливают их метастатическую активность непосредственно через β -адренорецепторы и циклоаденозинмонофосфат-протеинкиназа А-зависимый путь, что было выявлено на моделях рака молочной железы, лёгкого, предстательной железы и прямой кишки [19, 20].

Известно влияние нейромедиаторов на динамику как опухолевого роста, так и метастазирования [21–24]. В клинической научной литературе обсуждаются наблюдения о возможном влиянии психотропных лекарственных средств на течение злокачественных опухолевых процессов [25, 26].

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), основной тормозной медиатор центральной нервной системы, оказывает существенное влияние на пролиферацию злокачественных клеток и распространение опухолевого процесса [23]. Бензодиазепиновые соединения широко применяются в настоящее время в клинической практике как анксиолитические, седативные, снотворные лекарственные средства. В качестве основной центральной фармакологической мишени бензодиазепина диазепам рассматривается бензодиазепиновый модуляторный сайт ГАМК_A рецептора, периферической — митохондриальный транспортный белок 18кДа («периферический бензодиазепиновый рецептор, TSPO18), присутствие которого установлено в периферических тканях (как нормальных, так и с признаками воспаления, опухолях) и в ЦНС (глиоцитах, нервных стволовых клетках и в постмитотических нейрональных предшественниках) [27].

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* продемонстрирована способность диазепама влиять на развитие злокачественной опухоли, оказывать ингибирующее действие на активность натуральных киллеров [28–30]. Установлено, что диазепам (3 мг/кг при введении внутрь) стимулирует рост карциномы Эрлиха (асцитной формы) у мышей, что проявляется в увеличении числа опухолевых клеток в асцитной жидкости и объёма асцитной жидкости [28]. Этот эффект не наблюдался в меньших дозах препарата (0,3 или 1 мг/кг, внутрь) [29]. Вместе с тем, исследования *in vitro* показали, что низкие (наномолярные) концентрации лигандов TSPO18 увеличивают пролиферацию клеток рака молочной железы MDA-MB-231 [31] и глиомы C6 [32], а высокие дозы (микромольные концентрации) лигандов TSPO18 вызывают гибель клеток опухолевых культур [33].

Эффекты диазепама на экспериментальную карциному Эрлиха объясняются исключительно периферическими механизмами, вполне обосновано опираясь на данные о наличии в асцитной жидкости определённой концентрации диазепама при его введении внутрь, способности диазепама индуцировать активные формы кислорода в тканях опухоли, связываться с TSPO18 опухолевых клеток и ряд других фактов [28]. В доступной научной литературе мы не нашли экспериментальных работ, которые рассматривали бы потенциальную возможность участия центральных структур регуляции эмоций млекопитающих в проопухолевых эффектах диазепама на модели карциномы Эрлиха *in vivo*.

Целью настоящего исследования явилось изучение роли функциональной активности бензодиазепинового сайта центрального ГАМК_A рецептора и митохондриального транспортного белка 18кДа («периферического бензодиазепинового рецептора», TSPO) в механизме стимулирующего влияния диазепама на рост карциномы Эрлиха.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. В исследовании использованы мыши самцы популяции SHK массой 20–25 г, полученные из филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России (Московская область). Животных содержали в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утверждёнными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51. Организацию и проведение работы осуществляли в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом Минздрава РФ №199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского

Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Вещества. В качестве препарата исследования использовали субстанцию диазепама гидрохлорида (сибазон). Для селективной фармакологической блокады бензодиазепинового сайта ГАМК_A рецептора использовали флумазенил (5 мг/кг, Sigma/Merck). Для селективной блокады митохондриального транспортного белка использовали соединение PK11195 (5 мг/кг, Sigma/Merck). Диазепам, флумазенил и PK11195 вводили в виде эмульсии, приготовленной с использованием Twin-80 и 0,9 % раствора натрия хлорида. Эмульсию Twin-80 и 0,9 % раствора натрия хлорида (растворитель) использовали в качестве контроля. Вещества вводили в объёме 0,1 мл на 10 г один раз в сутки 7 дней подряд. Флумазенил вводили подкожно или интрагастрально, PK11195 — подкожно, диазепам — интрагастрально.

Опухоль. В качестве модели опухоли использовали перевиваемую асцитную карциному Эрлиха диплоидной формы (АОЭд), полученную из ФГБНУ «Научно-исследовательский Институт морфологии человека». В течение эксперимента АОЭд поддерживали перевивкой мышам внутрибрюшинно по 0,2 мл разведённой асцитной жидкости в соотношении 0,3 мл асцитной жидкости, полученной непосредственно от мыши-донора, и 0,7 мл физиологического раствора. Перевивку осуществляли 1 раз в 9 дней. Первоначальная прививка (первый пассаж) была осуществлена путём внутрибрюшинного введения 0,25 мл неразведённого асцитного препарата после предварительного размораживания. При прививке опухоли мышам экспериментальных групп в брюшную полость вводили 0,2 мл суспензии отмытых опухолевых клеток с содержанием приблизительно 3×10^6 клеток (концентрация суспензии 15×10^6 клеток /мл с 80–90 % содержанием жизнеспособных опухолевых клеток).

Методика подсчёта цитоза клеток карциномы Эрлиха в асцитной (выпотной) жидкости. Цитоз полученной после аспирации из брюшной полости перитонеальной жидкости оценивали с помощью гематометра (камера Горяева). Камеру готовили по общепринятой методике, притирали покровное стекло до появления колец Ньютона. С целью гемолиза эритроцитов выпот смешивали с жидкостью Тюрка в соотношении 10 мкл выпота и 990 мкл разбавителя, тщательно перемешивали и оставляли на 15 мин. После окончания инкубации аликвоту жидкости вносили в счётную камеру, инкубировали в течение 1–2 минут для оседания клеток и производили подсчёт клеток суммарно в 100 больших квадратах камеры. Для подсчёта клеток опухоли использовали микроскоп Nikon Eclipse Ci-L с увеличением 1×10 .

Подсчёт цитоза клеточной суспензии в 1 мкл выпота проводили по формуле:

$$X = A \times B / B \times G,$$

где: А — количество опухолевых клеток, подсчитанное в 100 больших квадратах;

Б — степень разведения выпота (100);

В — количество маленьких квадратиков в 100 больших квадратах (1600);

Г — объём счётной камеры над маленьким квадратиком ($1/4000 \text{ мм}^3$). После пересчёта, формула имеет вид: X (клеток в мкл выпота) = $A \times 250$. Рост опухоли оценивали по объёму выпота брюшной опухоли, концентрации опухолевых клеток в 1 мкл и суммарному количеству опухолевых клеток, определяемых в объёме выпота.

Тест «открытое поле». Для оценки тревожных реакций мышей использовали тест «открытое поле» с выделением ориентировочно-исследовательской реакции (ОИР) и индекса тревожности [34]. В течение 2 мин после помещения животного в установку регистрировали горизонтальную двигательную активность у стенок площадки и в её центральной части, вертикальную активность и число обследованных отверстий в полу установки. При суммировании перечисленных выше параметров определяли коэффициент ОИР (Коир), индекс тревожности определяли по изменению соотношения перемещений мыши в центральной части установки к сумме активности в центре и на периферии и фиксировали число животных, осуществлявших полный переход в центральные квадраты [34].

Дизайн эксперимента. *Эксперимент 1.* При изучении влияния диазепама на рост опухоли в сочетании с оценкой его поведенческих эффектов мыши были рандомизированы на 3 группы: 1) растворитель (р-р NaCl 0,9 % + Twin-80); 2) диазепам (0,03 мг/кг); 3) диазепам (3 мг/кг). Части мышей через 1 ч после первого введения контрольного раствора или диазепама вводили приготовленную асцитную суспензию. В течение последующих 6 дней мышам вводили контрольный раствор или растворы диазепама 1 раз в сутки. На седьмой день опыта (через 1 ч после последнего введения веществ) привитых опухолью животных подвергали эвтаназии и собирали асцитную жидкость, что было аналогично дизайну [32]. Животных, предназначенных для поведенческих экспериментов, не подвергали опухолевой прививке. На седьмой день опыта (через 1 ч после последнего введения веществ) мышей тестировали в установке «открытое поле».

Эксперимент 2. Второй этап был посвящён изучению роли ГАМК_A рецептора и TSPO в механизме действия диазепама на рост асцитной карциномы Эрлиха и на поведенческие реакции мышей при использовании фармакологических блокаторов. Животные были распределены по следующим группам: 1) растворитель — подкожно и интрагастрально с интервалом 30 мин; 2) растворитель — подкожно и через 30 мин диазепам (0,03 мг/кг); 3) флумазенил и диазепам (0,03 мг/кг) с интервалом 15 мин; 4) РК11195 и диазепам (0,03 мг/кг) с интервалом 30 мин. Через 1 ч после первого введения комбинации веществ мышам вводили приготовленную

асцитную суспензию, и затем в течение последующих 6 дней вводили комбинации веществ 1 раз в сутки. На седьмой день опыта (через 1 ч после последнего введения веществ) мышей подвергали эвтаназии и собирали асцитную жидкость. Животные, предназначенные для поведенческих экспериментов, получали комбинацию веществ однократно, после чего через 1 ч их использовали в поведенческом тесте.

Эксперимент 3. Третий этап исследования был посвящён изучению влияния интревсного агониста ГАМК_A рецептора флумазенила на развитие карциномы Эрлиха и на ориентировочно-исследовательскую реакцию мышей. Для этого мыши были распределены на две группы: 1) растворитель интрагастрально; 2) флумазенил интрагастрально. Экспериментальная процедура была аналогична таковой на первом этапе работы.

Статистическая обработка. Экспериментальные группы состояли из 6–10 мышей. Для статистической обработки применяли программу Prism (версия 8.0.1. (244)). После проверки гипотезы о нормальности распределения по критерию Шапиро–Уилка данные были представлены или в виде медианы с указанием межквартильного интервала или в виде среднего значения с указанием стандартного отклонения. Для статистической обработки использовали непарный критерий Стьюдента, однофакторный критерий ANOVA с последующим применением критерия множественных сравнений Ньюмена–Кейлса, критерий Крускала–Уолеса с последующим сравнением по критерию Данна при множественном сравнении, критерий Манна–Уитни при сравнении двух выборок. Результаты, выраженные в %, обрабатывали по методу оценки выборочных долей вариант. Различия между группами полагали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

По результатам первой и второй серий экспериментов установлено, что диазепам при субхроническом интрагастральном введении в дозе 0,03 мг/кг усиливает рост асцитной карциномы, увеличивая общее количество опухолевых клеток в 1,5–2 раза по сравнению с группой мышей, получающих растворитель ($p \leq 0,05$; критерий Дана) (рис. 1В и 2В). Результаты, полученные на мышах самцах популяции SHK, согласуются с известными в научной литературе экспериментальными данными о стимулирующем влиянии диазепама на рост асцитной карциномы Эрлиха у мышей [29] и результатами клинических метаанализов, указывающих на бензодиазепины как фактор риска злокачественных опухолей [26, 35]. Вместе с тем, в нашем исследовании диазепам оказывает эффект на опухоль в дозе на два порядка меньшей, нежели в работе Sakai M et al. [29]. Доза диазепама (3 мг/кг), активная в работе зарубежных коллег,

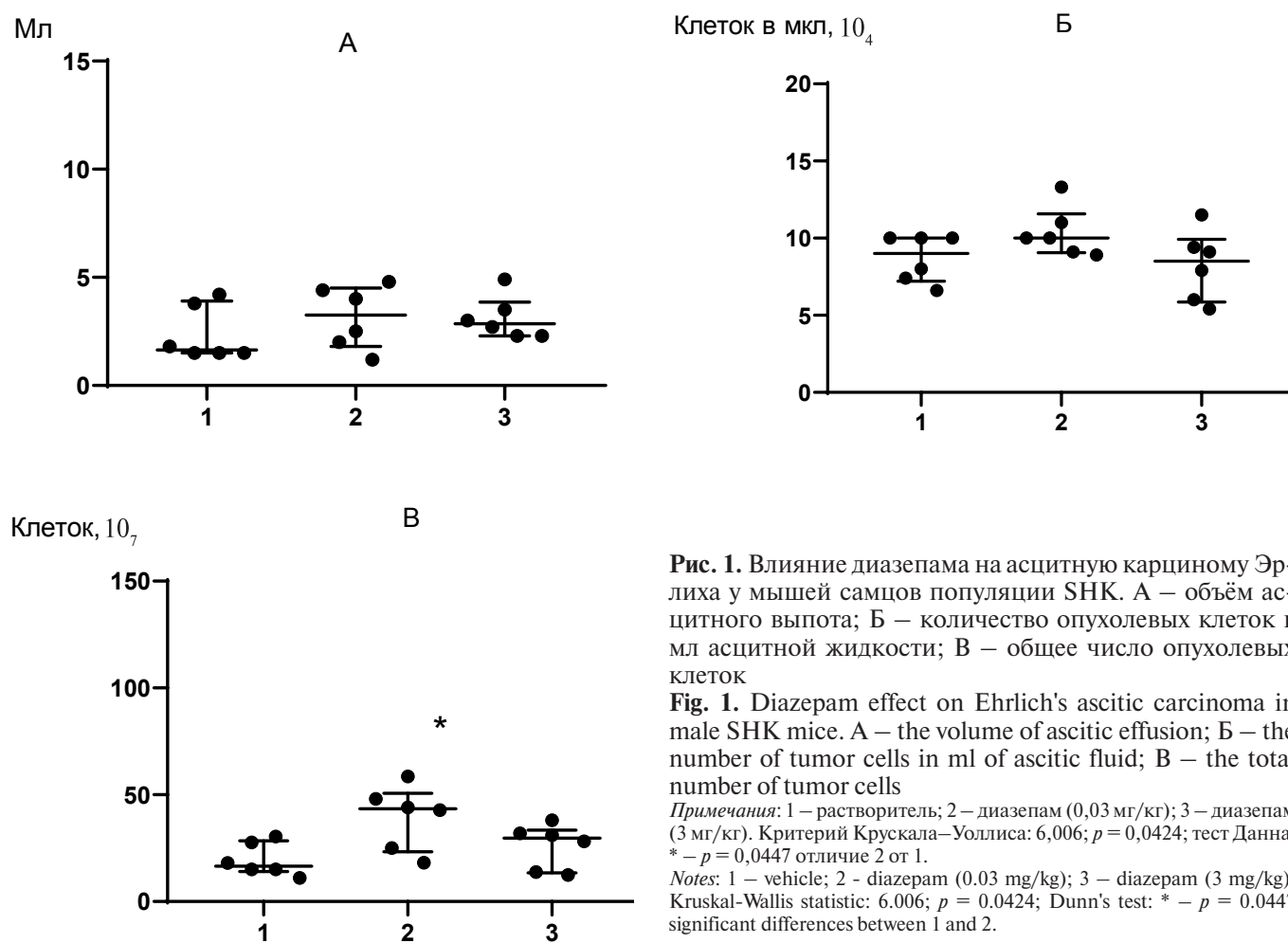


Таблица 1

Эффекты диазепама при субхроническом итрагастральном введении на ориентировочно-исследовательскую реакцию у мышей SHK в тесте «открытое поле»

Table 1

Diazepam *per os* sub-chronic administration effects on the orienting-exploratory responses in the “open field” test in SHK mice

Горизонтальная активность			Вертикальная активность	Число исследованных отверстий	Коир	% животных, выходящих в центр
Ц	П	Ц/(Ц+П) × 100, %				
Растворитель 7 введений (n = 20)						
10,6± 2,2	34,5± 4,1	23,4 % (211/900)	8,1±1,8	7,9±1,0	58,1 ±7,2	85 % (17/20)
Диазепам 0,03 мг/кг 7 введений (n = 16)						
13,3±2,8	54,9 ±6,2*	19,5 %* (213/1091)	9,1± 2,3	6.3±1,9	83,4 ±9,6	87,5 (14/16)
Диазепам 3 мг/кг 7 введений (n = 15)						
14,6±2,3	63,3±6,8**	18,8 %* (219/1168)	6,9±1,3	4,1±0,8	88,8±7,3*	93,3 (14/15)

Примечания: n – количество мышей в группе; *,** – отличие диазепама от растворителя при $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; Ц – суммарная горизонтальная активность в центральной части установки; Ц+П – суммарная горизонтальная активность в центральной и периферической части установки; Ц/(Ц+П)×100 – индекс тревожности (%). Уменьшение индекса указывает на усиление тревожных реакций.

Notes: n – number of mice in the group; *,** – differences between diazepam and vehicle with value $p \leq 0.05$; $p \leq 0.01$; Ц is the sum of horizontal activities in the central part of the experimental arena; Ц+П is the sum of the horizontal activities in the central and peripheral parts of the arena; Ц/(Ц+П)×100 – anxiety index (%). The index decrease indicates an anxiety increase.

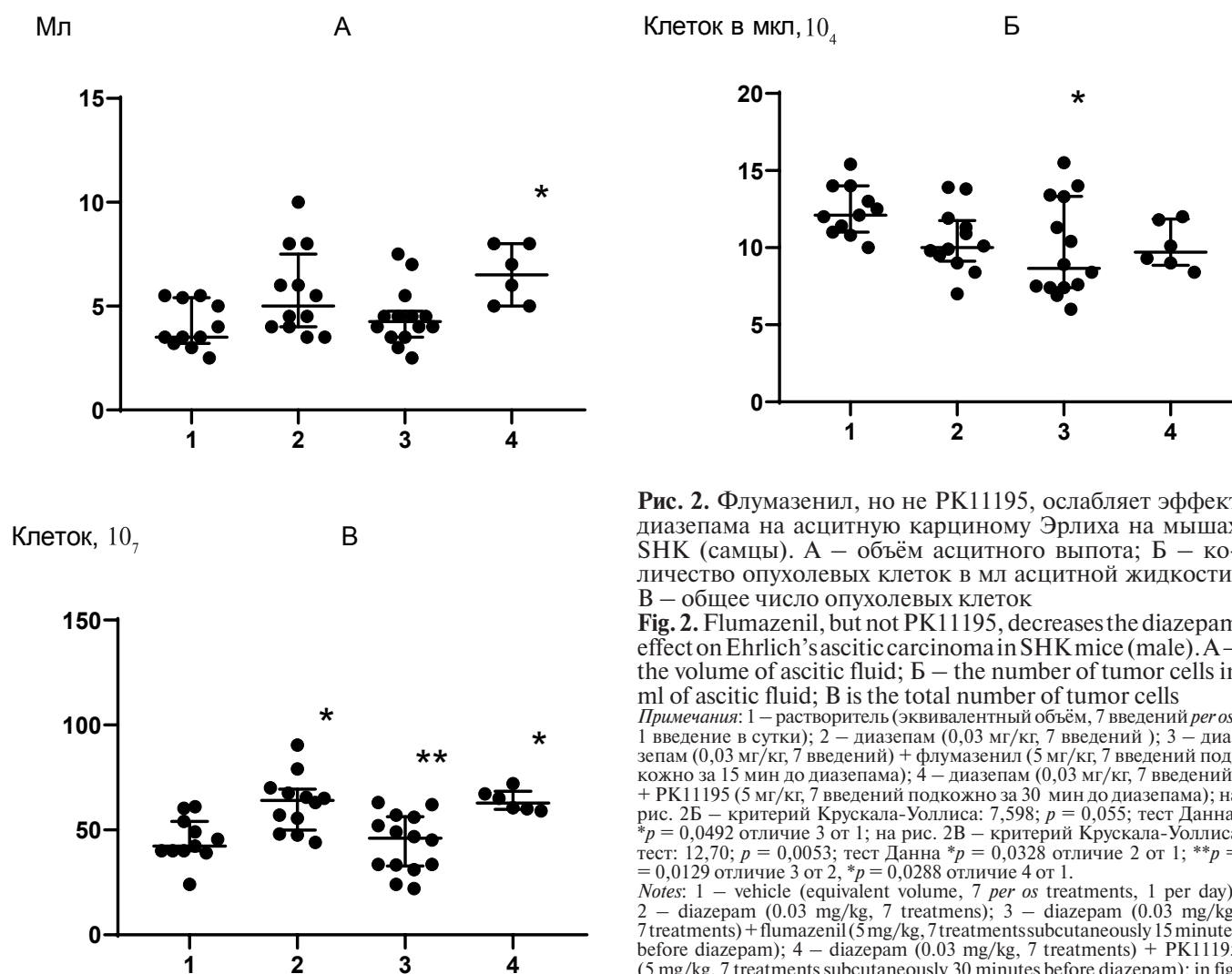


Рис. 2. Флумазенил, но не PK11195, ослабляет эффект диазепама на асцитную карциному Эрлиха на мышцах SHK (самцы). А — объём асцитного выпота; Б — количество опухолевых клеток в мл асцитной жидкости; В — общее число опухолевых клеток

Fig. 2. Flumazenil, but not PK11195, decreases the diazepam effect on Ehrlich's ascitic carcinoma in SHK mice (male). A — the volume of ascitic fluid; Б — the number of tumor cells in ml of ascitic fluid; В is the total number of tumor cells

Примечания: 1 — растворитель (эквивалентный объём, 7 введений *per os*, 1 введение в сутки); 2 — диазепам (0,03 мг/кг, 7 введений); 3 — диазепам (0,03 мг/кг, 7 введений) + флумазенил (5 мг/кг, 7 введений подкожно за 15 мин до диазепама); 4 — диазепам (0,03 мг/кг, 7 введений) + PK11195 (5 мг/кг, 7 введений подкожно за 30 мин до диазепама); на рис. 2Б — критерий Крускала-Уоллиса: 7,598; $p = 0,055$; тест Данна: $*p = 0,0492$ отличие 3 от 1; на рис. 2В — критерий Крускала-Уоллиса: 12,70; $p = 0,0053$; тест Данна $*p = 0,0328$ отличие 2 от 1; $**p = 0,0129$ отличие 3 от 2, $*p = 0,0288$ отличие 4 от 1.

Notes: 1 — vehicle (equivalent volume, 7 *per os* treatments, 1 per day); 2 — diazepam (0.03 mg/kg, 7 treatments); 3 — diazepam (0.03 mg/kg, 7 treatments) + flumazenil (5 mg/kg, 7 treatments) subcutaneously 15 minutes before diazepam); 4 — diazepam (0.03 mg/kg, 7 treatments) + PK11195 (5 mg/kg, 7 treatments) subcutaneously 30 minutes before diazepam); in fig. 2B — Kruskal-Wallis statistic: 7.598; $p = 0.055$; Dunn's test: $*p = 0.0492$ differences between 3 and 1; in fig. 2B — Kruskal-Wallis statistic: 12.70; $p = 0.0053$; Dunn test $*p = 0.0328$ differences 2 from 1; $**p = 0.0129$ differences between 3 and 2, $*p = 0.0288$ differences 4 from 1.

в нашем исследовании не вызывала каких-либо изменений по сравнению с растворителем, возможно, по причине неконтролируемых методических причин (особенности популяции животных, штамм опухоли).

В тесте «открытое поле» показано, что диазепам в обеих изученных дозах при субхроническом интрагастральном введении вызывает увеличение двигательной активности самцов в периферической части установки (отличие от растворителя при $p \leq 0,05$), что свидетельствует об усилении тревожных реакций у мышей данной популяции (табл. 1).

Таким образом, на мышцах самцах SHK установлено, что стимулирующее действие на рост карциномы Эрлиха малой дозы диазепама (0,03 мг/кг) сочетается с усилением тревожных реакций у животных. Однако усиление тревожных реакций наблюдается в обеих изученных дозах, что свидетельствует об отсутствии ассоциативной связи между проопухолевым действием

диазепама и его проанксиогенными свойствами.

В группе мышей, получавших комбинацию флумазенила и диазепама, наблюдается уменьшение концентрации опухолевых клеток в 1,3 раза (при $p \leq 0,05$) по сравнению с группой животных, которым вводили только растворитель (рис. 2Б), и уменьшение общего количества опухолевых клеток в 1,4 раза по сравнению с группой, получавшей только диазепам (рис. 2В). Комбинированное применение селективного блокатора TSP0 соединения PK11195 и диазепама увеличивает объём асцита и клеточность карциномы по сравнению с растворителем (при $p \leq 0,05$) (рис. 2А, 2В), в то время как диазепам увеличивает только клеточность опухоли.

Как представлено в табл. 2, в тесте «открытое поле» мыши самцы SHK, получавшие однократно комбинацию «растворитель—диазепам 0,03 мг/кг», демонстрируют селективное усиление тревожных реакций без изменения общей двигательной актив-

Таблица 2

Влияние флумазенила и соединения РК11195 на эффекты диазепама (0,03 мг/кг) в тесте «открытое поле» у мышей SHK

Table 2

Effect of flumazenil and compound PK11195 on the effects of diazepam (0.03 mg/kg) in the “open field” test in SHK mice

Горизонтальная активность			Вертикальная активность	Число исследованных отверстий	Коир	% животных, выходящих в центр
Ц	П	Ц/(Ц+П) × 100, %				
Растворитель – растворитель, (n = 9)						
2,7±1,2	31,0± 4,7	7,9 % (24/303)	0,8 ± 0,4	1,8±1,2	36,2±5,5	66,7 % (6/9)
Растворитель – Диазепам 0,03 мг/кг, (n = 8)						
1,0±0,6	29,8±3,5	3,3 %* (8/244)	0,2 ± 0,1	2,0 ±0,4	32,9±4,1	25,0 % (2/8)
Флумазенил 5 мг/кг – диазепам 0,03 мг/кг, (n = 9)						
4,2± 1,6	43,0±5,0	8,9 %** (38/425)	1,4±0,7	1,7±0,4	50,3±6,2	66,7 % (6/9)
РК11195 5 мг/кг – диазепам 0,03 мг/кг, самцы (n = 9)						
0,8±0,4	31,8±6,0	2,4 %**. (7/293)	1,3±0,3	2,2±0,5	36,1±6,3	44,4 % (4/9)

Примечания: n – количество мышей в группе; * – отличие от растворителя при $p \leq 0,05$; ** – отличие от диазепама при $p \leq 0,01$; ** – отличие от растворителя и группы флумазенил+диазепам при $p \leq 0,01$ (метод сравнения выборочных долей вариантов); Ц – горизонтальная активность в центральной части установки; Ц+П – суммарная горизонтальная активность в центральной и периферической части установки; Ц/(Ц+П)×100 – индекс тревожности (%). Уменьшение индекса указывает на усиление тревожных реакций.

Notes: n – number of mice in the group; * – differences compare to vehicle with value $p \leq 0,05$; ** – differences compare to diazepam with value $p \leq 0,01$; ** – differences compare to vehicle or “flumazenil+diazepam” group with value $p \leq 0,01$ (exact Fisher’s test); Ц is the sum of horizontal activities in the central part of the experimental arena; Ц+П is the sum of the horizontal activities in the central and peripheral parts of the arena; Ц/(Ц+П)×100 – anxiety index (%). The index decrease indicates an anxiety increase.

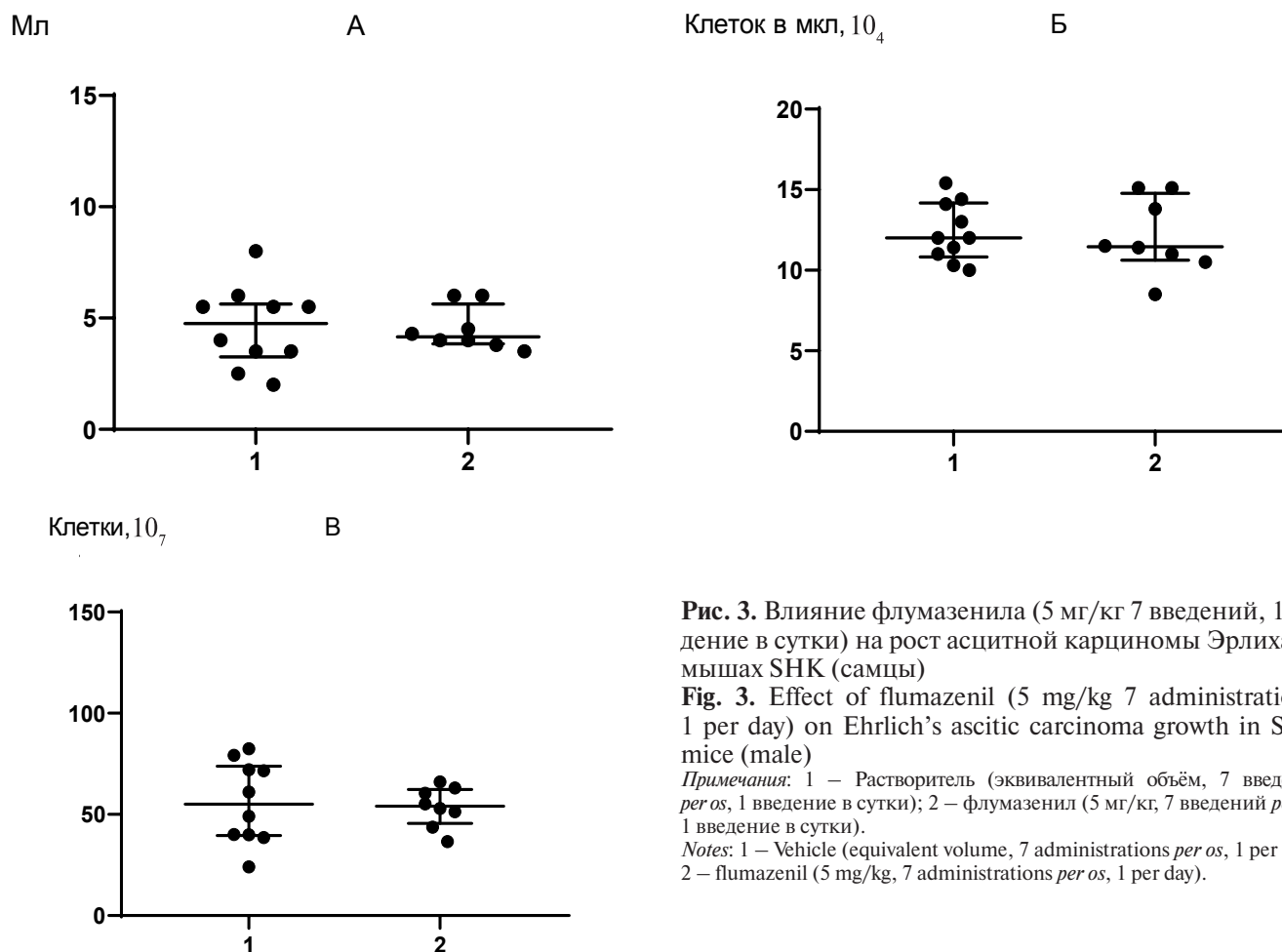


Рис. 3. Влияние флумазенила (5 мг/кг 7 введений, 1 введение в сутки) на рост асцитной карциномы Эрлиха на мышах SHK (самцы)

Fig. 3. Effect of flumazenil (5 mg/kg 7 administrations, 1 per day) on Ehrlich's ascitic carcinoma growth in SHK mice (male)

Примечания: 1 – Растворитель (эквивалентный объём, 7 введений per os, 1 введение в сутки); 2 – флумазенил (5 мг/кг, 7 введений per os, 1 введение в сутки).

Notes: 1 – Vehicle (equivalent volume, 7 administrations per os, 1 per day); 2 – flumazenil (5 mg/kg, 7 administrations per os, 1 per day).

Таблица 3

Влияние флумазенила (5 мг/кг, интрагастрально) на ориентировочно-исследовательскую реакцию у мышей SHK в тесте «открытое поле»

Table 3

Effect of flumazenil (5 mg/kg, per os) on the orienting-exploratory responses in the “open field” test in SHK mice

Горизонтальная активность			Вертикальная активность	Число исследованных отверстий	Коир	% животных, выходящих в центр
Ц	П	Ц/(П+П) x 100, %				
Растворитель per os, мыши SHK, самцы (n = 9)						
1,8 ± 0,8	30,8±6,9	5,4 % (14/260)	0,8±0,4	2,0±0,5	35,4±7,9	44,4 % (4/9)
Флумазенил 5 мг/кг per os, мыши SHK, самцы (n = 10)						
2,2 ± 0,9	27,7±5,0	7,4 % (22/299)	0,9±0,4	2,2±0,6	32,9±6,1	60,0 % (6/10)
<i>Примечания:</i> n – количество мышей в группе; Ц – горизонтальная активность в центральной части установки; Ц+П – суммарная горизон- тальная активность в центральной и периферической части установки; Ц/(Ц+П)×100 – индекс тревожности (%).						
<i>Notes:</i> n – number of mice in the group; Ц is the sum of horizontal activities in the central part of the experimental arena; Ц/(Ц+П)×100 is the sum of the horizontal activities in the central and peripheral parts of the arena; Ц/(Ц+П)×100 – anxiety index (%).						

ности по сравнению с мышами из группы «растворитель–растворитель» (при $p \leq 0,05$), что согласуется с ранее полученными данными об усилении тревожных реакций у мышей этой популяции при субхроническом введении диазепама (0,03 мг/кг). В группе мышей, которым вводили комбинацию флумазенила и диазепама, регистрируется восстановление соотношения центральной и периферической двигательной активности до контрольных значений, что свидетельствует об ингибировании вызванного диазепамом в дозе 0,03 мг/кг усиления тревожных реакций. Как представлено в табл. 2, комбинация РК11195 с диазепамом аналогично диазепаму вызывает селективное усиление тревожных реакций в тесте «открытое поле».

Таким образом, было установлено, что селективный инверсный агонист центрального ГАМК_A рецептора флумазенил ингибирует и поведенческие эффекты диазепама, и его стимулирующее влияние на развитие асцитной карциномы Эрлиха. Эффекты диазепама при его комбинации с блокатором митохондриального транспортера 18 кДа не отличаются ни по способности стимулировать рост опухоли, ни по влиянию на ориентировочно-исследовательскую реакцию мышей. Полученные данные не противоречат экспериментальным данным, свидетельствующим о стимулирующем эффекте РК11195 (3 мг/кг при интрагастральном введении) на развитие асцитной карциномы Эрлиха на мышцах самцах популяции Swiss [29].

При изучении влияния интрагастрального применения флумазенила (5 мг/кг) на рост асцитной карциномы Эрлиха установлено отсутствие изменений и объема асцитной жидкости, и концентрации опухо-

левых клеток, и их общего числа по сравнению с растворителем (рис. 3). Применение одного флумазенила (5 мг/кг, интрагастрально) не оказывает влияние на поведение мышей в тесте «открытое поле» по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что диазепам при субхроническом интрагастральном введении обладает свойством усиливать рост асцитной карциномы Эрлиха избирательно в меньшей изученной дозе. Большая доза диазепама не оказывает влияния на развитие опухоли, но обе дозы вызывают усиление тревожных реакций у мышей, что даёт основания скорее всего для отрицательного ответа на вопрос о наличии ассоциативной связи между проопухолевыми и психотропными свойствами диазепама, по крайней мере влиянием на тревожность. В пользу наличия такой взаимосвязи могут свидетельствовать экспериментальные результаты об ослаблении эффектов диазепама (0,03 мг/кг) и на опухоль, и на тревожное поведение при блокаде бензодиазепинового сайта ГАМК_A рецептора. Данные о том, что флумазенил способен ослаблять проопухолевое действие диазепама, могут указывать на участие центральных ГАМК_A рецептора в данном эффекте. Вопрос о том, в какой степени можно проводить ассоциацию между центральными эффектами диазепама и его способностью влиять на рост карциномы Эрлиха, требует дальнейшего исследования, и в первую очередь, необходимо провести сравнительные исследования эффектов диазепама на рост карциномы у животных с альтернативным фенотипом эмоциональной реакции на стресс.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Калинина Т.С. — экспериментальный дизайн, разработка модели, постановка задачи, написание текста, интерпретация результатов; Шимширт А.А. — разработка модели, выполнение экспериментов, статистическая обработка, интерпретация результатов, редакция текста; Лисицкая К.В. — экспериментальная работа, статистическая обработка, интерпретация результатов; Волкова А.В. — экспериментальная работа (опухоль, поведение); Кудряшов Н.В. — экспериментальная работа (поведение), статистическая обработка.

Conflict of interests. Kalinina TS — experimental design, model development, problem statement, text (original draft), interpretation of results; Shimshirt AA — model development, experiments, statistical processing, interpretation of results, text editing; Lisitskaya KV — experimental work, statistical processing, interpretation of results; Volkova AV — experiment performing (tumor, behavior); Kudryashov NV — experiment performing (behavior), statistical processing.

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00298.

Financing. The investigation is supported by RFBR grant N 19-015-00298.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Калинина Татьяна Сергеевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: tat.calinina2009@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0178-3567>

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

Kalinina Tatiana S.

Corresponding author

e-mail: tat.calinina2009@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0178-3567>

Dr. Sci. (Biol.), Leading researcher Laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Шимширт Александр Александрович

e-mail: spring05-79@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6913-3248>

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

Shimshirt Alexandr A.

e-mail: spring05-79@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6913-3248>

PhD Biological Sci., Researcher Laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Лисицкая Ксения Валерьевна

e-mail: lisksenia@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3922-5253>

к. б. н., н. с. лаборатории биомедицинских исследований Института биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Lisitskaya Ksenia V.

e-mail: lisksenia@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3922-5253>

PhD Biological Sci., Researcher Laboratory of biomedical research Bach Institute of Biochemistry RAS FSI «Federal Research Centre 'Fundamentals of Biotechnology' RAS, Moscow, Russia

Волкова Анна Валерьевна

e-mail: volk16@inbox.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0914-2825>

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

Volkova Anna V.

e-mail: volk16@inbox.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0914-2825>

Researcher Laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Кудряшов Никита Викторович

e-mail: kunvi@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1819-1867>

к. б. н., с. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Kudryashov Nikita V.

e-mail: kunvi@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1819-1867>

PhD Biological Sci., Senior researcher Laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia; FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russia

Список литературы / References

- Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global Cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 2012;13(8):790–801. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70211-5.
- Mehnert A, Brahler E, Faller H, et al. Four-week prevalence of mental disorders in patients with cancer across major tumor entities. *J Clin Oncol.* 2014;32(31):3540–3546. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.0086.
- Prasad SM, Eggen SE, Lipsitz SR, Irwin MR, Ganz PA, Hu JU. Effect of depression on diagnosis, treatment, and mortality of men with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32(23):2471–2478. DOI: 10.1200/JCO.2013.51.1048.
- Capo-Ramos DE, Gao Y, Check DP, Goldin LR et al. Mood disorders and risk of lung cancer in the EAGLE case-control study and in the U.S. veterans affairs inpatient cohort. *PLoS One.* 2012;7(8):e42945. DOI: 10.1371/journal.pone.0042945.
- Cole SW. Nervous system regulation of the cancer genome. *Brain Behav Immun.* 2013; 30 Suppl(Suppl):S10–8. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.11.008.
- Lutgendorf SK, Sood AK. Biobehavioral factor and cancer progression: physiological pathways and mechanisms. *Psychosom Med.* 2011;73(9):724–730. DOI: 10.1097/PSY.0b013e318235be76.
- Chen SH, Zhang BY, Zhou B, Zhu CZ, Sun LQ, Feng YJ. Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche. *Am J Cancer Res.* 2019;9(1):1–21.
- Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X et al. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science.* 2013;341(6142):1236361. DOI: 10.1126/science.1236361.
- Ayala GE, Dai H, Powell M, Li R et al. Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(23):7593–7603. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1164.
- Liebig C, Ayala G, Wilrs JA, Berger DH et al. Perineural invasion in cancer. *Cancer.* 2009;115(15):3379–33791. DOI: 10.1002/cncr.24396.
- Kowalski PJ, Paulino AF. Perineural invasion of pancreatic-cancer cells carcinoma: Its causation/promotion by brain-derived neurotrophic factor. *Hum Pathol.* 2002;33(9):933–936. DOI: 10.1053/hupa.2002.128249.
- Okada Y, Takeyama H, Sato M, Morikawa M et al. Experimental implication of celiac ganglionotrophic invasion of pancreatic-cancer cells bearing c-ret proto-oncogene with reference to glial-cell-line-derived neurotrophic factor(GDNF). *Int J Cancer.* 1999; 81(1):67–73. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19990331)81:1<67::aid-ijc13>3.0.co;2-v
- Dewi TJ, Verhaagen J. Role of semaphorins in the adult nervous system. *Prog Neurobiol.* 2003;71(2-3):249–267. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2003.06.001.
- Laconi E et al. Early exposure to restraint stress enhances chemical carcinogenesis in rat liver. *Cancer Lett.* 2000;161(2):215–220. DOI: 10.1016/s0304-3835(00)00621-2.
- Melamed R, Rosenne E, Shakh K, Schwartz Y, Abudarham N, Ben-Eliyahu S. Marginating pulmonary-NK activity and resistance to experimental tumor metastasis: suppression by surgery and the prophylactic use of a beta-adrenergic antagonist and a prostaglandin synthesis inhibitor. *Brain Behav Immun.* 2005;19(2):114–126. DOI: 10.1016/j.bbi.2004.07.004.
- Dhabhar FS, McEwen BS. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J Immunol.* 1996;156(7):2608–2615.
- Kalinichenko VV, Mokyr MB, Graf LH Jr, Coh1991en RL, Chambers DA. Norepinephrine-mediated inhibition of antitumor cytotoxic T lymphocyte generation involves a beta-adrenergic receptor mechanism and decreased TNF-alpha gene expression. *J Immunol.* 1999 Sep 1;163(5):2492–2499. PMID: 10452985.
- Andersen BL et al. Stress and immune responses after surgical treatment for regional breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(1):30–36. DOI: 10.1093/jnci/90.1.30
- Badino GR, Novelli A, Girardi C, Di Carlo F. Evidence for functional beta-adrenoceptor subtypes in CG-5 breast cancer cell. *Pharmacology Research.* 1996;33:255–260. DOI: 10.1006/phrs.1996.0036.
- Marchetti B, Spinola PG, Pelletier G, Labrie F. A potential role for catecholamines in the development and progression of carcinogen-induced mammary tumors: hormonal control of β -adrenergic receptors and correlation with tumor growth. *Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;38(3):307–320. DOI: 10.1016/0960-0760(91)90102-b.
- Young StZ, Bordey A. GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiology (Bethesda).* 2009;24:171–185. DOI: 10.1152/physiol.00002.2009.
- Sarroui D, Clarhaut J, Defamie N, Mesnil M. Serotonin and cancer: what is the link? *Curr Mol Med.* 2015;15(1):62–77. DOI: 10.2174/1566524015666150114113411.
- Ortego A. A new role of GABA: inhibition of tumor cells migration. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(4):151–154. DOI: 10.1016/S0165-6147(03)00052-X.
- Iacovelli L, Arcella A, Battaglia G, Pazzaglia S, Aronica E, Spinsanti P, Caruso A, DeSmaele E, Saran A, GulinAo, D'Onofrio M, Giangaspero F, Nicoletti F. Pharmacological activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors inhibits the growth of medulloblastomas. *J Neurosci.* 2006;26(32):8388–8397. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2285-06.2006.
- Iqbal U, Nguyen PA, Syed-Abdul S, Yang HC, Huang CW, Jian WS, Hsu MH, Yen Y, Li YJ. Is long-term use of benzodiazepine a risk for cancer? *Medicine (Baltimore).* 2015;94(6):e483. DOI: 10.1097/MD.0000000000000483
- Wernli KJ, Hampton JM, Trentham-Dietz A, Newcomb P. Antidepressant medication use and breast cancer risk. *Pharmacoevidemol Drug Saf.* 2009;18(4):284–290. DOI: 10.1002/pds.1719.
- Varga B, Markó K, Hádinger N, Jelítai M, Demeter K, Tihanyi K, Vas A, Madarász E. Translocator protein (TSPO 18kDa) is expressed by neural stem and neuronal precursor cells. *Neurosci Lett.* 2009;462(3):257–262. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.06.051.
- Sakai M, Fonseca ES, Dagli ML, Palermo-Neto J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. *Life Sci.* 2006;78(16):1777–1783. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.08.015.
- Sakai M, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Ribeiro A, Quinteiro-Filho WM, Rone MB, Martinez-Arguelles DB, Dagli ML, Papadopoulos V, Palermo-Neto J. Translocator protein (18 kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells *in vivo*. *Eur J Pharmacol.* 2009;626(2-3):131–138. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.09.036.
- Stepień H, Agro A, Padol I, Stanisław A. Inhibitory effect of diazepam on human natural killer activity *in vitro*. *Cytobios.* 1994;77(310):131–136.
- Hardwick M, Fertikh D, Culty M, Li H, Vidic B, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res.* 1999;59(4):831–842.
- Ikezaki K, Black KL. Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepine. *Cancer Lett.* 1990;49(2):115–120. DOI: 10.1016/0304-3835(90)90146-o.
- Kletsas D, Li W, Han Z, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) and PBR drug ligands in fibroblast and fibrosarcoma cell proliferation: role of ERK, c-Jun and ligand-activated PBR-independent pathways. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(10):1927–1932. DOI: 10.1016/j.bcp.2004.01.021.
- Кудряшов Н.В., Наплёкова П.Л., Волкова А.В. и др. Влияние острого плавательного стресса на поведенческие и нейрхимические эффекты производного пиразоло [С] пиридина ГИЖ-72 и диазепам у мышей BALB/с и C57BL/6. *Российский физиологический журнал им. Сеченова.* 2021;107(8):973–995. [Kudryashov NV, Naplekova PL, Volkova AV et al. The influence of acute swimming stress on the behavioral and neurochemical effects of pyrazole[C]pyridine derivative GIZH-72 and diazepam in BALB/C and C57BL/6 mice. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im I.M. Sechenova.* 2021;107(8):973–995. (In Russ.).] DOI: 10.31857/S0869813921080082.
- Amerio A, Gálvez JF, Odone A, Dalley AD, Ghaemi SN. Carcinogenicity of psychotropic drugs: A systematic review of US Food and Drug Administration–required preclinical *in vivo* studies. *Aust N Z J Psychiatry.* 2015;49(8):686–696. DOI: 10.1177/0004867415582231.

Влияние селанка на морфин-индуцированную анальгезию в опытах *in vivo*

Надорова А. В., Чернякова И. В., Колик Л. Г.

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

Аннотация. *Актуальность.* Эндогенная опиоидная система вовлечена в процессы нейроадаптации при действии экзогенных опиоидов. Синтезированный на основе регуляторного пептида тафтсина анксиолитик селанк угнетает активность энкефалин-деградирующих ферментов, повышая содержание лей-энкефалинов в плазме крови. *Цель работы.* Оценить влияние селанка (0,3 и 0,9 мг/кг, в/б) на морфин-индуцированную анальгезию в опытах *in vivo*. *Методы.* Эксперименты выполнены на инбредных мышцах-самцах линии C57Bl/6 ($n = 77$). Тест «горячая пластина» использовали для оценки анальгетического действия препаратов при термической стимуляции ноцицепторов при помещении мышей на нагретую до $55 \pm 0,5$ °C металлическую пластину с последующей регистрацией латентного периода реакции через 30, 60, 90 и 120 мин после введения морфина. *Результаты.* Морфин в дозе 3,0 мг/кг, в/б, вызывал антиноцицепцию с максимально возможным эффектом (МБЭ) 9 %, селанк в дозе 0,9 мг/кг, не обладая антиноцицептивными свойствами *per se*, при предварительном введении с морфином увеличивал латентный период реакции, вызывая антиноцицепцию с МБЭ 29,9 %. *Заключение.* Впервые получены данные о синергическом эффекте селанка и морфина в ослаблении острой соматической боли.

Ключевые слова: морфин; селанк; анальгезия; лекарственное взаимодействие; мыши

Для цитирования:

Надорова А. В., Чернякова И. В., Колик Л. Г. Влияние селанка на морфин-индуцированную анальгезию в опытах *in vivo*. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1):30–35. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-30-35>

Поступила: 24 февраля 2022 г. **Принята:** 02 марта 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

Selank effects on morphine-induced analgesia *in vivo* experiments

Nadorova AV, Chernyakova IV, Kolik LG

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. *Background.* The endogenous opioid system is involved in neuroadaptation produced by exogenous opioids. Synthesized on the basis of the regulatory peptide tuftsin, the anxiolytic selank inhibits the activity of enkephalin-degrading enzymes, increasing the level of leu-enkephalins in blood plasma. The aim of the work was to evaluate the effect of selank (0,3 and 0,9 mg/kg, i.p.) on morphine-induced analgesia in animal models. *Methods.* The experiments were performed in inbred male mice C57Bl/6 ($n = 77$). The "hot plate" test was used to evaluate the analgesic effect during thermal stimulation of nociceptors when mice were placed on a metal plate heated to $55 \pm 0,5$ °C, followed by registration of the latent period of the reaction 30, 60, 90, and 120 minutes after the administration of morphine. *Results.* Morphine at a dose of 3,0 mg/kg, i.p., caused antinociception with the maximum possible effect (MBE) of 9 %, selank at a dose of 0,9 mg/kg, without antinociception *per se*, when pretreated with the morphine, increased the latent reaction time, causing antinociception of 29,9 % MBE. *Conclusion.* For the first time the data obtained on the synergistic effect of selank and morphine in attenuation of acute somatic pain.

Keywords: morphine; selank; analgesia; drug interaction; mice

For citations:

Nadorova AV, Chernyakova IV, Kolik LG. Selank effects on morphine-induced analgesia *in vivo* experiments. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):30–35. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-30-35>

Received: February 24, 2021. **Accepted:** March 02, 2022. **Published:** March 30, 2022.

Введение / Introduction

Стремительный рост потребления препаратов опиоидного ряда является серьезной проблемой, что в значительной степени обусловлено частым назначением наркотических анальгетиков [1]. На долю населения США ежегодно приходится около 68 % прописанных в мире опиоидов, и более 2 млн взрослых американцев страдают расстройствами, связанными с употреблением наркотических анальгетиков [2]. Скорее всего, в обозримом будущем эти препараты будут по-прежнему востребованы при терапии острых и хронических болевых синдромов [3]. Несмотря на значительный интерес к разработке новых обезболивающих с низким риском формирования лекарственной зависимости, внедрение в клиническую практику альтернативных стратегий занимает много лет и сопровождается высокими финансовыми затратами. С каждым годом становится актуальной задача

репозиционирования лекарственных средств (ЛС), уже прошедших одобрение в регуляторных органах [4], чтобы уменьшить использование опиоидов и обеспечить стабильное облегчение боли с минимальными побочными эффектами. Комбинация низких доз ЛС из разных фармакологических классов является признанной стратегией предотвращения потенциальных нежелательных эффектов опиоидов. Далее представлен краткий анализ взаимодействия опиоидных анальгетиков с анксиолитическими средствами разной природы.

Сопутствующее применение препаратов бензодиазепинового ряда считается наиболее распространенной причиной смертности от передозировки опиоидов, назначаемых по медицинским показаниям [5]. На экспериментальных моделях ноцицепции диазепам противодействует морфину в зависимости от используемого теста: отсутствие антагонизма при длительной стимуляции («формалиновый» тест) и выраженный антагонизм при кратковременном термическом сти-

муле («горячая пластина» и «отдергивание хвоста») [6]. Согласно экспериментальным данным, другой агонист бензодиазепиновых рецепторов мидазолам также снижает латентный период реакции у мышей в тесте «горячая пластина» на фоне действия морфина [7].

Буспирон, применяемый для терапии тревожно-депрессивных расстройств, взаимодействует с многочисленными рецепторами, в том числе как агонист рецептора серотонина (5-HT)_{1A} и антагонист дофаминовых D₂, D₃ и D₄-рецепторов, при этом обладает самостоятельным антиноцицептивным действием при термической стимуляции [8]. Более того, анальгетическое действие в тесте «горячая пластина» было в 5,8 раз выше при сочетанном применении буспилона с морфином по сравнению с самостоятельными эффектами препаратов [9].

Циталопрам, селективный ингибитор обратного захвата серотонина, при остром введении усиливает анальгетическое действие морфина, а при хроническом — препятствует развитию толерантности к антиноцицептивным эффектам морфина у мышей [10]. С другой стороны, антиноцицептивный эффект морфина, сниженный при моделировании непредсказуемого хронического стресса у мышей, восстанавливается при предварительном введении ингибитора обратного захвата норадреналина мапротилина, что свидетельствует о том, что действие морфина в условиях хронического стресса может быть усилено активацией норадренергической системы [11].

Совокупность представленных в научной литературе данных указывает на разнонаправленное действие применяемых в клинической практике анксиолитиков, которые способны потенцировать [9], ослаблять [7, 12, 13] или не влиять [6, 14] на морфин-индуцированную анальгезию.

Отечественный препарат Селанк®, синтезированный на основе эндогенного регуляторного пептида тафтсина (рис. 1), разработан и изучен в качестве анксиолитического средства для терапии генерализованных тревожных расстройств [15].

Механизм действия селанка преимущественно связывают с изменением функционального состояния

серотонинергической системы [16, 17] и влиянием на ГАМК-ергическую систему в качестве аллостерического модулятора [18, 19]. При расширенном изучении особенностей противотревожного действия селанка показано, что на фоне предварительной блокады опиатных рецепторов ответ «низкотревожных» мышей линии C57Bl/6 на пептидный аналог тафтсина усиливается [20], что указывает на значимость активности энкефалинопиоидной системы в формировании индивидуальной чувствительности к селанку, однако данные о возможном взаимодействии селанка с опиоидными анальгетиками в настоящее время отсутствуют.

Цель работы — оценка влияния пептидного аналога тафтсина селанка на морфин-индуцированную анальгезию в опытах *in vivo*.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Эксперименты выполнены на инбредных мышцах-самцах линии C57Bl/6 (n=77) с массой тела 18–22 г. (филиал «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»). Животных содержали по 15 особей в клетке в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (температура 21–23 °С, относительная влажность воздуха 40–60 %) при естественной освещённости и свободном доступе к воде и брикетированному корму в течение 10 суток до начала тестирования. Содержание животных соответствовало правилам надлежащей лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», межгосударственным стандартам серии «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» ГОСТ 33215–2014 и ГОСТ 33216–2014 (Приложение А к Европейской конвенции о защите Позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123)). Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Препараты. Селанк (Thy-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro, субстанция (ИМГ РАН)) в дозе 0,3 и 0,9 мг/кг, морфина гидрохлорид (Минмедбиопром объединение «Чимкентбиофарм», субстанция) в дозе 3,0 мг/кг растворяли в воде для инъекций и вводили из расчёта 0,1 мл/10 г массы животного согласно схеме эксперимента:

- «Контроль» — вода для инъекций + через 30 минут вода для инъекций;
- «Селанк» — селанк + через 30 минут вода для инъекций;
- «Морфин» — вода для инъекций + через 30 минут раствор морфина;

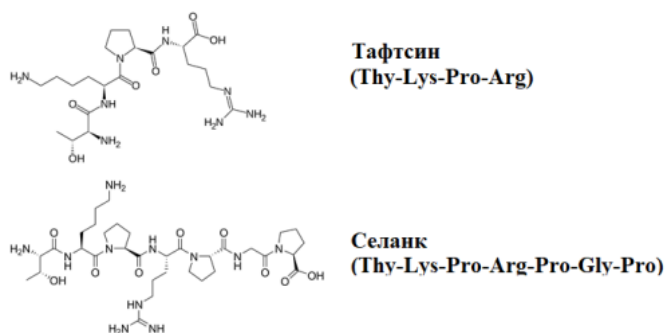


Рис. 1. Структурные формулы тафтсина и селанка
Fig. 1. Structural formulas tuftsin and selank

— «Селанк + Морфин» — селанк + через 30 минут раствор морфина.

Выбор дозы морфина основан на ранее выполненных исследованиях [13].

Тест «горячая пластина» использовали для оценки ноцицептивной реакции. С помощью анальгезиметра «Ugo Basile» (Италия) регистрировали латентное время реакции (лизание лап или прыжок). До начала опыта отбирали животных на основе базовой реактивности в условиях экспериментальной модели, исключая мышей, остававшихся на нагретой до $55 \pm 0,5$ °C пластине дольше 10 с. Латентный период в 20 с (максимальное время экспозиции) расценивали как 100 % анальгезию. Фиксировали время появления реакции у мышей через 30, 60, 90 и 120 мин после введения изучаемых препаратов. Полученные результаты выражали в виде максимально возможного эффекта (МВЭ) в %. $\text{МВЭ} = (\text{латентный период реакции после введения препарата} - \text{латентный период реакции}) / (\text{максимальное время экспозиции} - \text{латентный период реакции}) \times 100\%$

Статистический анализ проводили при помощи двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим применением критерия Дункана. Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$.

Результаты исследований и обсуждение / Results and discussion

Изучено действие гептапептидного аналога тафтсина селанка, применяемого в качестве быстродействующего анксиолитика, на морфин-индуцированную анальгезию у мышей. Морфин в дозе 3,0 мг/кг через 60, 90 и 120 мин после системного введения вызывал анальгетическое действие, увеличивая латентный период реакции по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$; $p < 0,05$ и $p < 0,05$, соответственно) (рис. 2А–Б). Селанк в эффективных анксиолитических дозах 0,3 и 0,9 мг/кг не обладал антиноцицептивными свойствами *per se* (рис. 2А–Б). При предварительном введении селанк в низкой дозе 0,3 мг/кг не влиял на вызываемую морфином анальгезию (рис. 2А), однако

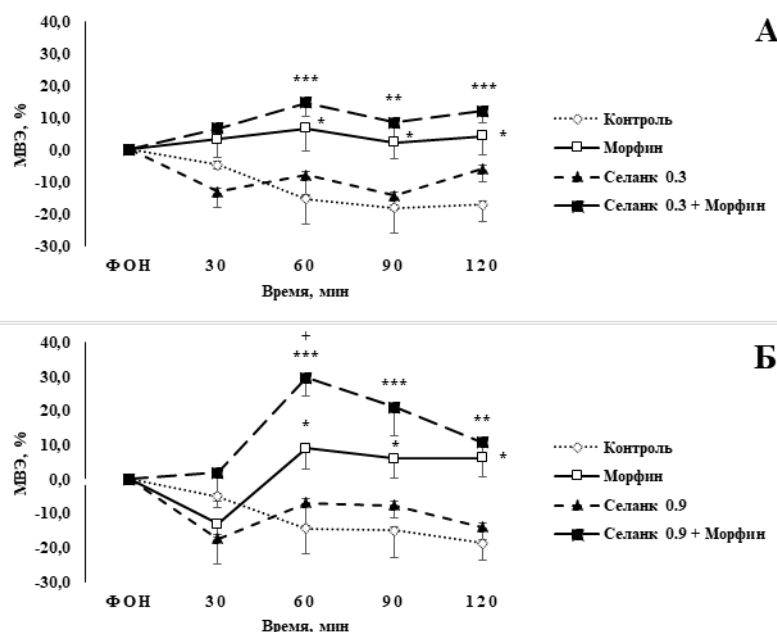


Рис. 2. Действие селанка в дозах 0,3 мг/кг (А) и 0,9 мг/кг (Б) на морфин-индуцированную анальгезию при термическом раздражении ноцицепторов у мышей C57Bl/6 в тесте «Горячая пластина». $M \pm \text{SEM}$

Fig. 2. Effect of Selank at doses of 0.3 mg/kg (A) and 0.9 mg/kg (B) on morphine-induced analgesia during thermal stimulation of nociceptors in C57Bl/6 mice in the Hot Plate test. $M \pm \text{SEM}$

Примечание: А — ANOVA по фактору «вещество» $F(3, 132) = 18,649$, $p = 0,00000$; ANOVA по фактору «время» $F(3, 132) = 0,63622$, $p = 0,59296$; ANOVA по факторам «вещество/время» $F(9, 132) = 0,61635$, $p = 0,78145$; Б — ANOVA по фактору «вещество» $F(3, 144) = 19,055$, $p = 0,00000$; ANOVA по фактору «время» $F(3, 144) = 3,2767$, $p = 0,02289$; ANOVA по факторам «вещество/время» $F(9, 144) = 1,5863$, $p = 0,12451$. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ статистически значимо по отношению к группе «Контроль» для соответствующего отрезка времени; + — $p < 0,05$ статистически значимо по отношению к группе «Морфин» для соответствующего отрезка времени согласно критерию Дункана. Число животных в группах $n = 9-10$.

Notes: А — ANOVA factor «substance» $F(3, 132) = 18.649$, $p = 0.00000$; ANOVA factor «time» $F(3, 132) = 0.63622$, $p = 0.59296$; ANOVA «substance/time» interaction $F(9, 132) = 0.61635$, $p = 0.78145$; Б — ANOVA factor «substance» $F(3, 144) = 19.055$, $p = 0.00000$; ANOVA factor «time» $F(3, 144) = 3.2767$, $p = 0.02289$; ANOVA «substance/time» in-teraction $F(9, 144) = 1.5863$, $p = 0.12451$. Post hoc multiple comparisons were performed using Duncan's test. * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$ as compared to the respective «Control» group; + — $p < 0.05$ as compared to the respective «Morphine» group. The number of animals in groups $n = 9-10$.

в большой дозе 0,9 мг/кг селанк увеличивал латентный период реакции в 3 раза, вызывая через 60 мин после инъекции морфина антиноцицепцию с максимально возможным эффектом 29,9 %, что значительно превосходит самостоятельный МВЭ морфина 9 % на 60-й минуте тестирования в тесте «горячая пластина» (рис. 2Б). Потенцирующее действие селанка в дозе 0,9 мг/кг на морфин-индуцированную анальгезию постепенно ослабевало на 90- и 120-й минутах тестирования ($p > 0,05$ и $p > 0,05$, соответственно).

Большинство публикаций об антиноцицептивной активности тетрапептида тафтсина (*L*-threonyl-*L*-lysyl-*L*-prolyl-*L*-arginine) и его синтетических аналогов относятся к концу XX века, когда у тафтсина, открытого японскими учёными Najjar and Nishioka в 1970 г., было выявлено анальгетическое действие, не связанное с активацией опиоидных рецепторов и продолжающееся в течение 30 мин после инъекции [21]. Дальнейшее изучение антиноцицептивных свойств аналогов тафтсина показало разнообразие эффектов в ответ на термические стимулы. Так, D-Arg3-тафтсин превосходил исходный тетрапептид по активности и продолжительности действия [21], C-концевые фрагменты тафтсина D-Pro-D-Arg и D-Pro-L-Arg проявляли обезболивающую активность в течение 60 и 40 мин, соответственно [22], а дипептидные фрагменты L-Pro-D-Arg и Thr-Lys-Pro-Arg-NHA вообще не проявляли антиноцицептивного эффекта [22], поэтому было выдвинуто предположение о ведущей роли C-концевого дипептидного фрагмента тафтсина *L*-prolyl-*L*-arginine в реализации его обезболивающего действия при острой боли [23]. Следует отметить, что анальгетические свойства тафтсина и его аналогов регистрировали только при непосредственном введении в желудочки мозга. В этой связи отсутствие собственной анальгетической активности при системном введении у селанка как гептапептидного аналога тафтсина не противоречит ранее полученным данным.

В нашей работе морфин в дозе 3,0 мг/кг, в/б, вызывал антиноцицептивную реакцию с максимально возможным эффектом 9 % через 60 мин после инъекции анальгетика, что несколько ниже значений, описанных Jokinen *V et al.*, где морфин в дозе 2,5 мг/кг, п/к, вызывал в тесте «горячая пластина» антиноцицепцию 28 % МВЭ у крыс [24]. Подобное расхождение можно объяснить, во-первых, различием в межвидовой чувствительности к опиоидам, а во-вторых, тем, что для морфин-индуцированной анальгезии характерны значительные циркадные ритмы, оцениваемые по задержкам реакции грызунов на термическую стимуляцию, причём более высокие значения наблюдаются в тёмное время суток [25]. Последнее открытие демонстрирует, что различия во взаимодействиях между лекарственными препаратами, зависящие от времени введения, необходимо учитывать как в экспериментальных исследованиях, так и в клинических условиях.

Согласно систематическому обзору, опубликованному в 2015 г., наиболее распространёнными механизмами, вызывающими взаимодействие между ЛС при терапии болевых синдромов, были изменения метаболизма опиоидов путём ингибирования активности цитохрома P450 3A4 и фармакодинамические взаимодействия за счёт комбинированного воздействия на активность опиоидной, дофаминергической, холинергической и серотонинергической систем центральной нервной системы (ЦНС) [26]. Известно, что лей-энкефалины, не обладая самостоятельной анальгетической активностью, способны потенцировать вызываемую морфином анальгезию [27]. Поскольку селанк увеличивает период полувыведения лей-энкефалина в сыворотке крови больных с тревожными расстройствами [15] и почти в 20 раз снижает активность ферментов, гидролизующих энкефалины [28], можно предположить, что потенцирующее действие гептапептидного аналога тафтсина на опиоидную анальгезию реализуется за счёт увеличения содержания эндогенных опиоидов.

С другой стороны, в многочисленных экспериментальных исследованиях доказано модулирующее влияние селанка в диапазоне анксиолитических доз на функциональную активность серотонинергической [16, 17] и дофаминергической [16] систем. При однократном системном введении селанк изменял экспрессию ряда генов, кодирующих транспортёры ГАМК и ионные каналы [19]. Эти данные позволяют рассуждать о влиянии селанка на время нахождения ГАМК в синаптической щели и, как следствие, усиление тормозных процессов в ЦНС, что коррелирует с установленной в настоящей работе динамикой потенцирования анальгетического действия морфина.

К ограничениям работы следует отнести использование животных только одного пола (самцов), отсутствие экспериментальных моделей ноцицепции другой модальности (например, химическая или механическая стимуляция), применение селанка в ограниченном диапазоне доз и выбранная схема эксперимента, предусматривающая введение препарата перед наркотическим анальгетиком. Несомненно было бы полезно со всех точек зрения оценить влияние селанка на формирование толерантности к анальгетическому действию морфина при субхроническом введении.

Таким образом, полученные результаты о синергизме анксиолитика селанка и опиоидного анальгетика морфина в отношении ослабления острой соматической боли дополняют общий профиль фармакологической безопасности синтетического аналога тафтсина. Последующие исследования этого фармакологического взаимодействия могут иметь значение для формирования эффективных стратегий комплексной фармакотерапии тревожных расстройств, в особенности коморбидных с болевыми синдромами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ
ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors confirm the absence of a conflict of interest.

Участие авторов. Надорова А. В. — выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов, написание текста; Чернякова И. В. —

выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов; Колик Л. Г. — постановка задачи, написание текста, редактирование, финальное утверждение.

Participation of authors. Nadorova AV — performing experimental work, analyzing and interpreting results, writing text; Chernyakova IV — performing experimental work, analyzing and interpreting results; Kolik LG — problem statement, writing text, editing, final approval.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Надорова Анна Владимировна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: av-nadorova@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0463-2190>

н. с. лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Nadorova Anna V.

Corresponding author

e-mail: av-nadorova@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0463-2190>

Research scientist Laboratory of Pharmacological Regulation of Alcohol and Drug Addiction FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Чернякова Ирина Владимировна

к. м. н, в. н. с., лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Chernyakova Irina V.

Cand. Sci. Med., Leading researcher Laboratory of Pharmacological Regulation of Alcohol and Drug Addiction FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Колик Лариса Геннадьевна

e-mail: lgkolik@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>

SPIN-код: 9126-6922

д. б. н., профессор РАН, руководитель лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kolik Larisa G.

e-mail: lgkolik@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>

SPIN code: 9126-6922

Dr. Sci. (Biol.), Professor RAS, Head Laboratory of Pharmacological Regulation of Alcohol and Drug Addiction FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Brady KT, McCauley JL, Back SE. Prescription Opioid Misuse, Abuse, and Treatment in the United States: An Update. *Am J Psychiatry*. 2016 Jan;173(1):18–26. DOI: 10.1176/appi.ajp.2015.15020262.
2. Smit T, Rogers AH, Garey L, Allan NP, Viana AG, Zvolensky MJ. Anxiety sensitivity and pain intensity independently predict opioid misuse and dependence in chronic pain patients. *Psychiatry Res*. 2020 Dec;294:113523. DOI: 10.1016/j.psychres.2020.113523.
3. Fields HL. The doctor's dilemma: opiate analgesics and chronic pain. *Neuron*. 2011. Feb 24;69(4):591–594. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.02.001.
4. Corsello SM, Bittker JA, Liu Z, Gould J, McCarren P, Hirschman JE, Johnston SE, Vrcic A, Wong B, Khan M, et al. The Drug Repurposing Hub: a next generation drug library and information resource. *Nat Med*. 2017 Apr 7;23(4):405–408. DOI: 10.1038/nm.4306.
5. Jann M, Kennedy WK, Lopez G. Benzodiazepines: a major component in unintentional prescription drug overdoses with opioid analgesics. *J Pharm Pract*. 2014;27(1):5–16. DOI: 10.1177/0897190013515001.
6. Rosland JH, Hunskaar S, Hole K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. *Pharmacol Toxicol*. 1990 May;66(5):382–386. DOI: 10.1111/j.1600-0773.1990.tb00766.x.
7. Luger TJ, Hayashi T, Lorenz IH, Hill HF. Mechanisms of the influence of midazolam on morphine antinociception at spinal and supraspinal levels in rats. *Eur J Pharmacol*. 1994 Dec 27;271(2-3):421–431. DOI: 10.1016/0014-2999(94)90802-8.
8. Korneyev AY and Seredenin SB. Effect of 5-HT_{1A} receptor agonists on paw licking reaction on hot plate and unpunished drinking in rat. *Life Sci*. 1993;52(12):997–1004. DOI: 10.1016/0024-3205(93)90191-5.
9. Wilkerson JL, Felix JS, Restrepo LF, Ansari MI, Coop A, McMahon LR. The Effects of Morphine, Baclofen, and Buspirone Alone and in Combination on Schedule-Controlled Responding and Hot Plate Antinociception in Rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019 Sep;370(3):380–389. DOI: 10.1124/jpet.118.255844.
10. Varela MJ, Acanda de la Rocha AM, Diaz A, Lopez-Gimenez JF. Potentiation of morphine-induced antinociception and locomotion by citalopram is accompanied by anxiolytic-like effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2017 Dec;163:83–89. DOI: 10.1016/j.pbb.2017.10.003.
11. Ide S, Satoyoshi H, Minami M, Satoh M. Amelioration of the reduced antinociceptive effect of morphine in the unpredictable chronic mild stress model mice by noradrenalin but not serotonin reuptake inhibitors. *Mol Pain*. 2015 Aug 11;11:47. DOI: 10.1186/s12990-015-0051-0.

12. Pakulska W, Czarnecka E. Effect of diazepam and midazolam on the antinociceptive effect of morphine, metamizol and indomethacin in mice. *Pharmazie*. 2001 Jan;56(1):89–91.
13. Колик Л.Г., Жуков В.Н., Середенин С.Б. Влияние афобазола на антиноцицептивные свойства морфина. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009;72(1):22–23. [Kolik LG, Zhukov VN, Seredenin SB. Afobazole effects on antinociceptive properties of morphine. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2009;72(1):22–23. (In Russ).]. DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2009-72-1-22-23>.
14. Константинопольский М.А., Чернякова И.В., Колик Л.Г. Экспериментальная оценка влияния ладастена и ГБ-115 на развитие толерантности к анальгетическому действию морфина. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2016;(2):40–45. [Konstantinopolsky MA, Chernyakova IV, Kolik LG. Experimental assessment of ladasten and GB-115 effects on the antinociceptive tolerance to morphine. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2016;(2):40–45. (In Russ).].
15. Зозуля А.А., Незнамов Г.Г., Сюняков Т.С., Каст П.В., Габаева М.В., Соколов О.Ю., Серебрякова Е.В., Сираничева О.А., Андрищенко А.В., Телешева Е.С., Сюняков С.А., Смулевич А.Б., Мясоедов Н.Ф., Середенин С.Б. Эффективность и возможные механизмы действия нового пептидного анксиолитика селанка при терапии генерализованного тревожного расстройства и невралгии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2008;108(4):38–48. [Zozulya AA, Neznamov GG, Syunyakov TS, Kast NV, Gabaeva MV, Sokolov OYu, Serebryakova EV, Siranchieva OA, Andryushchenko AV, Telesheva ES, Syunyakov SA, Smulevich AB, Myasoedov NF, Seredenin SB. Efficacy and possible mechanisms of action of a new peptide anxiolytic selank in the therapy of generalized anxiety disorders and neurasthenia. *Zhurnal neurologii i psixiatrii im S.S. Korsakova*. 2008;108(4):38–48. (In Russ).].
16. Наркевич В.Б., Кудрин В.С., Клодт П.М., Покровский А.А., Козловская М.М., Майский А.И., Раевский К.С. Влияние гептапептида селанка на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей линий BALB/C и C57Bl/6: сравнительное изучение. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008;71(5):8–12. [Narkevich VB, Kudrin VS, Klodt PM, Pokrovskii AA, Kozlovskaya MM, Maiskii AI, Raevskii KS. Effects of heptapeptide selank on the content of monoamines and their metabolites in the brain of BALB/C and C57Bl/6 mice: a comparative study. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2008;71(5):8–12. (In Russ).]. DOI: [10.30906/0869-2092-2008-71-5-8-12](https://doi.org/10.30906/0869-2092-2008-71-5-8-12).
17. Надорова А.В., Колик Л.Г., Клодт П.М., Наркевич В.Б., Наплёкова П.Л., Козловская М.М., Кудрин В.С. Соотношение анксиолитического действия селанка и уровня серотонина в отдельных структурах мозга при моделировании алкогольной абстиненции у крыс. *Нейрохимия*. 2014;31(2):147–153. [Nadorova AV, Kolik LG, Klodt PM, Narkevich VB, Naplyokova PL, Kozlovskaya MM, Kudrin VS. The relationship between the anxiolytic action of selank and the level of serotonin in brain structures during the modeling of alcohol abstinence in rats. *Neurochemical journal*. 2014;8(2):115–120. (In Russ).]. DOI: [10.1134/S1819712414020081](https://doi.org/10.1134/S1819712414020081).
18. Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. Пептидная регуляция специфического лигандрецепторного взаимодействия ГАМК с плазматическими мембранами нервных клеток. *Нейрохимия*. 2014;31(4):300–306. DOI: [10.7868/S1027813314040116](https://doi.org/10.7868/S1027813314040116).
- [Vyunova TV, Andreeva LA, Shevchenko KV, Shevchenko VP, Myasoedov NF. Peptide regulation of specific ligand-receptor interactions of GABA with the plasma membranes of nerve cells. *Neurochemical Journal*. 2014;8(4):259–264. (In Russ).]. DOI: [10.1134/S1819712414040114](https://doi.org/10.1134/S1819712414040114).
19. Volkova A, Shadrina M, Kolomin T, Andreeva L, Limborska S, Myasoedov N, Slominsky P. Selank Administration Affects the Expression of Some Genes Involved in GABAergic Neurotransmission. *Front Pharmacol*. 2016 Feb 18;7:31. DOI: [10.3389/fphar.2016.00031](https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00031).
20. Козловский И.И., Андреева Л.А., Козловская М.М., Надорова А.В., Колик Л.Г. О роли опиоидной системы в формировании особенностей анксиолитического действия пептидного препарата селанка. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2012;75(2):10–13. [Kozlovskii II, Andreeva LA, Kozlovskaya MM, Nadorova AV, Kolik LG. The role of opioid system in peculiarities of anti-anxiety effect of peptide anxiolytic selank. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2012;75(2):10–13. (In Russ).].
21. Herman ZS, Stachura Z, Opiełka L, Siemion IZ, Nawrocka E. Tuftsin and D-Arg3-tuftsin possess analgesic action. *Experientia*. 1981 Jan 15;37(1):76–77. DOI: [10.1007/BF01965580](https://doi.org/10.1007/BF01965580).
22. Nawrocka-Bolewska E, Kubik A, Szewczuk Z, Siemion IZ, Obuchowicz E, Golba K, Herman ZS. Further investigations on the antinociceptive activity of tuftsin analogs. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1991 Jul-Aug;43(4):281–288.
23. Herman ZS, Laskawiec G, Golba K, Kubik A, Siemion IZ. L-prolyl-L-arginine fragment of tuftsin peptide chain elicits analgesic action. *Naturwissenschaften*. 1985 Feb;72(2):85–86. DOI: [10.1007/BF00508137](https://doi.org/10.1007/BF00508137).
24. Jokinen V, Lilius TO, Laitila J, Niemi M, Rauhala PV, Kalso EA. Pregabalin enhances the antinociceptive effect of oxycodone and morphine in thermal models of nociception in the rat without any pharmacokinetic interactions. *Eur J Pain*. 2016 Feb;20(2):297–306. DOI: [10.1002/ejp.728](https://doi.org/10.1002/ejp.728).
25. Karakucuk EH, Yamanoglu T, Demirel O, Bora N, Zengil H. Temporal variation in drug interaction between lithium and morphine-induced analgesia. *Chronobiol Int*. 2006;23(3):675–682. DOI: [10.1080/07420520600650745](https://doi.org/10.1080/07420520600650745).
26. Kotlinska-Lemieszek A, Klepstad P, Haugen DF. Clinically significant drug-drug interactions involving opioid analgesics used for pain treatment in patients with cancer: a systematic review. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Sep 16;9:5255–5267. DOI: [10.2147/DDDT.S86983](https://doi.org/10.2147/DDDT.S86983).
27. Lee NM, Leybin L, Chang JK, Loh HH. Opiate and peptide interaction: effect of enkephalins on morphine analgesia. *Eur J Pharmacol*. 1980 Nov 21;68(2):181–185. DOI: [10.1016/0014-2999\(80\)90319-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(80)90319-2).
28. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Долотов О.В., Козик В.С., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Дорохова Е.М., Мешавкин В.К., Иноземцева Л.С., Габаева М.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Павлов Т.С., Бадмаева К.Е., Бадмаева С.Е., Бакаева З.В., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е., Васильковский Б.В., Гривенников И.А., Зозуля А.А., Мясоедов Н.Ф. Равномерно меченные тритием пептиды в исследованиях по их биодegradации *in vivo* и *in vitro*. *Биоорганическая химия*. 2006;32(2):183–191. [Zolotarev YuA, Dadayan AK, Dolotov OV, Kozik VS, Kost NV, Sokolov OYu, Doroknova EM, Meshavkin VK, Inozemtseva LS, Gabaeva MV, Andreeva LA, Alfeyeva LYu, Pavlov TS, Badmaeva KE, Badmaeva SE, Bakaeva ZV, Kopylova GN, Samonina GE, Vaskovsky BV, Grivennikov IA, Zozulya AA, Myasoedov NF. Evenly tritiumlabeled peptides in study of peptide *in vivo* and *in vitro* biodegradation. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2006;32(2):183–191. (In Russ).].

Миметик мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 оказывает нейропротекторные и нейрорегенеративные эффекты в условиях экспериментального ишемического инсульта

Поварнина П. Ю., Антипова Т. А., Логвинов И. О., Никифоров Д. М.

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

Аннотация. *Актуальность.* Димерный дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) (GSB-106), активирующий TrkB, PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC-γ1, был создан в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Для ГСБ-106 была выявлена нейропротекторная активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* при системном введении. *Цель.* В настоящем исследовании мы изучили влияние ГСБ-106 на объём инфаркта мозга, а также на нейрогенез и синаптогенез в условиях экспериментального ишемического инсульта, индуцированного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс, при его первом введении через 24 ч после моделирования ишемии. *Методы.* Дипептид ГСБ-106 вводили внутривентрикулярно в дозе 0,1 мг/кг 1 раз в день в течение 6 дней. На 7-й день мозговой материал собирали для морфометрических и биохимических (Вестерн-блот анализ) исследований. *Результаты.* Было установлено, что ГСБ-106 снижал объём инфаркта мозга в среднем на 24 %, стимулировал угнетённый нейро- и/или глиогенез (по маркеру пролиферации Ki-67) в гиппокампе и стриатуме и полностью восстанавливал иммунореактивность к синаптическим маркерам синаптофизину и PSD-95 в стриатуме ишемизированного полушария. *Заключение.* Таким образом, димерный дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 проявляет нейрорегенеративные свойства в условиях клинически значимого (24 ч) терапевтического окна на модели ишемического инсульта, и эти свойства предположительно обусловлены стимуляцией нейрогенеза (и/или глиогенеза) и синаптогенеза.

Ключевые слова: BDNF; дипептидный миметик; ишемический инсульт; нейрогенез; синаптогенез

Для цитирования:

Поварнина П. Ю., Антипова Т. А., Логвинов И. О., Никифоров Д. М. Миметик мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 оказывает нейропротекторные и нейрорегенеративные эффекты в условиях экспериментального ишемического инсульта. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1): 36–43. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-36-43>

Поступила: 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 января 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

The mimetic of the brain neurotrophic factor GSB-106 has neuroprotective and neuroregenerative effects in experimental ischemic stroke

Povarnina PYu, Antipova TA, Logvinov IO, Nikiforov DM

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. *Background.* A dimeric dipeptide mimetic of the brain-derived neurotrophic factor loop 4, bis(N-monosuccinyl-L-seryl-L-lysine) hexamethylenediamide (GSB-106), which activates TrkB, PI3K/AKT, MAPK/ERK and PLC-γ1 was created at the V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology. GSB-106 showed neuroprotective activity *in vitro* and *in vivo* at systemic administration. *Objective.* In the present study, we studied the effect of GSB-106 on the brain infarct volume, as well as on neurogenesis and synaptogenesis under conditions of experimental ischemic stroke induced by transient occlusion of the middle cerebral artery in rats, when it was first administered 24 h after ischemia onset. *Methods.* Dipeptide GSB-106 was administered i.p. in a dose of 0.1 mg/kg 24 h after surgery and then once a day, with the end of administration on the day 6 after surgery. On the day 7 brain samples were collected for morphometric and biochemical (Western-blot) analysis. *Results.* It was established that GSB-106 reduced the brain damage volume by 24%, restores impaired neurogenesis and/or gliogenesis (by Ki-67) in the hippocampus and in the striatum and completely restored the reduced immunoreactivity to synaptic markers synaptophysin and PSD-95 in the striatum. *Conclusions.* Thus, the dimeric dipeptide BDNF mimetic GSB-106 exhibits neuroregenerative properties at clinically relevant time window (24 h) in a model of ischemic stroke presumably due to stimulation of neurogenesis (and/or gliogenesis) and synaptogenesis.

Keywords: BDNF; dipeptide mimetic; ischemic stroke; neurogenesis; synaptogenesis

For citations:

Povarnina PYu, Antipova TA, Logvinov IO, Nikiforov DM. The mimetic of the brain neurotrophic factor GSB-106 has neuroprotective and neuroregenerative effects in experimental ischemic stroke. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):36–43. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-36-43>

Received: December 01, 2021. **Accepted:** January 15, 2022. **Published:** March 30, 2022.

Введение / Introduction

Мозговой нейротрофический фактор (миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) — нейротрофин, который присутствует практически во всех отделах головного мозга и играет важную роль

в поддержании нейропластичности [1]. BDNF рассматривается как перспективная фармакологическая мишень для лечения ряда психических и неврологических заболеваний [2].

Накоплено большое количество экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о высоком терапевтическом потенциале BDNF для

лечения постинсультного состояния. Так, содержание BDNF в плазме крови у людей в острую фазу инсульта коррелирует со степенью дальнейшего восстановления неврологических функций [3]. В условиях экспериментального ишемического инсульта у грызунов, вызванного окклюзией средней мозговой артерии, экзогенный BDNF снижает объем инфаркта мозга с максимальным эффектом 70 % и улучшает неврологический статус [4–6]. Кроме того, на моделях церебральной ишемии показана стимуляция нейрогенеза под действием BDNF [7, 8]. Однако BDNF имеет серьезные ограничения для применения в клинике, основные из которых — это проблема его доставки в центральную нервную систему и плеiotропность. Эти ограничения могут быть преодолены путем создания низкомолекулярных миметиков BDNF, обладающих удовлетворительными фармакокинетическими свойствами и реализующих только полезные эффекты полноразмерного нейротрофина. Такие соединения в настоящее время разрабатываются рядом научных групп [9–11].

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова на основе оригинальной гипотезы о том, что у нейротрофинов фармакофорными являются наиболее экспонированные участки их петлеобразных структур, чаще всего центральные участки бета-изгибов [12] и того факта, что для проявления агонистической активности необходима димерная структура, был создан димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF (гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина)), лабораторный шифр ГСБ-106 [Патент РФ №2410392, 2010; Патент США US 9,683,014 B2, 2017; Патент ЕПВ EP 2397488, 2019; Патент КНР CN 102365294 B, 2016; Патент Индии 296506, 2018].

По данным Вестерн-блот анализа ГСБ-106 активирует специфические для BDNF TrkB-рецепторы и их основные пострецепторные сигнальные пути — PI3K/AKT, MAPK/ERK и PLC- γ 1 [13, 14]. Дипептид ГСБ-106 проявляет нейропротекторную активность на культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22 в широком диапазоне концентраций (10^{-5} – 10^{-8} М) в условиях окислительного стресса и глутаматной токсичности [15]. На ряде *in vivo* моделей показано, что ГСБ-106 при внутрибрюшинном (в/б) и пероральном введении проявляет, как и BDNF, антидепрессантоподобную активность [16]. Установлено, что ГСБ-106 проникает через гематоэнцефалический барьер [17] и нетоксичен [18].

На модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс ГСБ-106 при субхроническом в/б введении (начало введения через 4 ч после моделирования ишемии) на 60 % снижал объем инфаркта мозга и улучшал неврологический статус [13]. Для дипептида было также показано, что он полностью предотвращает стресс-индуцированные нарушения гиппокампального нейрогенеза у мышей [19], а также стимулирует гиппокампальный синаптогенез у мышей в физиологических условиях [20]. На основании вы-

шесказанного мы предположили, что ГСБ-106 может проявлять нейрорегенеративные эффекты в условиях экспериментального инсульта и таким образом обеспечивать терапевтический эффект в клинически значимые интервалы времени.

В настоящей работе было изучено влияние ГСБ-106 на объем инфаркта мозга, а также на нейрогенез и синаптогенез в условиях экспериментального ишемического инсульта, индуцированного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс, при первом введении соединения через 24 ч после операции. Такой режим введения ГСБ-106 был выбран, поскольку через 24 ч после начала ишемии формирование зоны инфаркта завершено [21], и снижение объема повреждения может быть обусловлено нейрорегенерацией, но не нейропротекцией. Показатели нейрогенеза и синаптогенеза определяли в гиппокампе и стриатуме методом Вестерн-блот анализа с использованием антител к маркеру пролиферации Ki-67 и маркерам синаптогенеза — синаптофизину и PSD-95. Выбор структур мозга обусловлен тем, что в гиппокампе локализована одна из основных нейрогенных зон взрослого мозга (субгранулярная зона), а стриатум является областью, наиболее подверженной повреждению при окклюзии средней мозговой артерии [22].

Материалы и методы / Materials and methods

Материалы / Materials

ГСБ-106 (гексаметилендиамид (бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) был синтезирован в Отделе химии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова как описано в работе [12]. $[\alpha]^{21D} = -42,3$ °(с 1; H₂O); Tпл = 153–161 °C.

Реактив Фолина был получен в компании Merck (Дармштадт, Германия); бычий сывороточный альбумин (BSA), Na-дезоксиколат, Na₃VO₄ и ингибиторный протеазный коктейль были получены в компании Sigma-Aldrich (Мюнхен, Германия); додецилсульфат-натрия (SDS), Tween-20, TEMED, бис-акриламид, Tris, дитиотреитол (DTT), ЭДТА, Тритон X-100, глицерин были фирмы Bio-Rad Laboratories (Геркулес, США); первичные антитела против PSD-95 и против Ki-67 были фирмы ThermoFisher Scientific (Уолтем, США); первичные антитела к синаптофизину и β -актину были получены в компании Santa Cruz Biotechnology (Гейдельберг, Германия); вторичные антитела anti-rabbit IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена, были фирмы Abcam (Кембридж, Великобритания).

Животные / Animals

Эксперименты были проведены на 41 крысе-самце линии Вистар, массой 220–250 г на момент начала эксперимента, полученной в филиале «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА. Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гра-

нулированному корму и воде. Эксперименты с животными проводили в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Моделирование ишемического инсульта / Modeling of ischemic stroke

Ишемический инсульт моделировали внутрисудистым перекрытием средней мозговой артерии нитью [22]. Все хирургические манипуляции осуществляли с помощью титановых микрохирургических инструментов. Крыс вводили в наркоз 5 % раствором хлоралгидрата (350 мг/кг, в/б). Выполняли срединный разрез в области шеи и выделяли с правой стороны шеи сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально — грудино-ключично-сосцевидной мышцей и медиально — грудино-подъязычной мышцей. В сонном треугольнике выделяли сонный сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом. Осторожно отделяли блуждающий нерв и накладывали микрохирургическую сосудистую титановую клипсу на общую сонную артерию. На внешнюю сонную артерию накладывали хлопчатобумажную нить, плотно затягивали. На внутреннюю сонную артерию накладывали викриловую нить, затягивали не плотно, после чего перерезали внешнюю сонную артерию проксимальнее наложения нити. Гепаринизированную нейлоновую нить диаметром 0,25 мм вводили через культю внешней сонной артерии во внутреннюю сонную артерию на глубину 19–21 мм (до перекрытия средней мозговой артерии) и фиксировали микрососудистой клипсой. Перекрытие кровотока осуществляли в течение 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне средней мозговой артерии. После извлечения нити культю внешней сонной артерии закрывали коагуляцией электрокаутером до полной герметичности. Ложнооперированные животные подвергались тем же процедурам, за исключением перерезания сосудов и введения нити. Срединный разрез шеи зашивали хлопчатобумажными нитями и обрабатывали стрептоцидом.

Дизайн эксперимента / Experiment design

Животных с экспериментальным инсультом случайным образом делили на 2 группы — группа «ОСМА» (окклюзия средней мозговой артерии) и группа «ОСМА+ГСБ-106». Дипептид ГСБ-106 растворяли в дистиллированной воде и вводили в/б в дозе 0,1 мг/кг через 24 ч после операции и затем 1 раз в сутки, окончание введения — на 6-е сутки после операции. Доза ГСБ-106 была выбрана на основа-

нии предыдущих экспериментов [13]. Животные из групп «л.о.» (ложная операция) и «ОСМА» получали в том же режиме воду для инъекций. На 7-е сутки после операции крыс декапитировали под глубоким наркозом (хлоралгидрат, 350 мг/кг, в/б), головной мозг извлекали при температуре 0–4 °С. Примерно у половины животных (6 из группы «л.о.», 6 из группы «ОСМА», 10 из группы «ОСМА+ГСБ-106») забирали мозг целиком для морфометрического анализа объёма ишемического повреждения; у другой половины животных (6 из группы «л.о.», 7 из группы «ОСМА» и 6 из группы «ОСМА+ГСБ-106») выделяли из повреждённого полушария стриатум и гиппокамп для дальнейших биохимических исследований. Схема эксперимента приведена на рис. 1.

Группы животных:

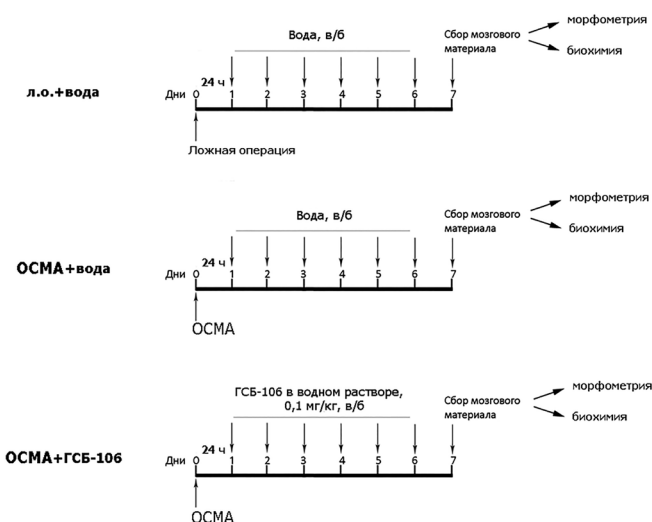


Рис. 1. Схема эксперимента
Fig. 1. Scheme of the experiment

Измерение объёма ишемического повреждения / Measurement of the volume of ischemic damage

Объём ишемического повреждения оценивали с помощью морфометрического анализа отсканированных изображений срезов мозга, окрашенных 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом (ТТХ) [23]. Для этого головной мозг помещали, чтобы отмыть от крови, в ёмкость с физиологическим раствором на 1 мин. Затем мозг замораживали при –20 °С в течение 12 мин и с помощью специальной формы с пазами для точной резки и микротомных лезвий разрезали на 5 фронтальных срезов толщиной 1,7 мм. Срезы мозга помещали в чашку Петри с 2 % раствором ТТХ в фосфатно-солевом буфере и инкубировали в течение 15 мин при 37 °С. Затем срезы переворачивали и инкубировали ещё 15 мин при 37 °С, после чего фиксировали в 10 % формалине в течение 30 мин. Затем срезы помещали на предметные стекла и сканировали с двух сторон с помощью планшетного сканера с раз-

решением 2400 dpi в режиме цветного изображения. С помощью свободно распространяемой программы «Image J» (National Institutes of Health, США) измеряли площадь инфаркта (неокрашенная область) и площадь всего среза.

Объем инфаркта определяли по формуле:

$$V = d \times \sum A_i / 2,$$

где: $\sum A_i$ – сумма площадей области повреждения на срезах мозга с каждой из сторон; d – толщина среза.

Определение уровня маркера пролиферации Ki-67 и синаптических маркеров / Determination of the level of the Ki-67 proliferation marker and synaptic markers

Стриатум и гиппокамп поврежденного полушария после извлечения замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Затем образцы гомогенизировали в лизис-буфере (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100) pH 7,5 в соотношении 1:5 (ткань:буфер) при температуре 4°C в течение 5 минут, затем помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали 10 минут при 13000 rpm и 4°C . Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Фолина–Лоури [24]. Белки разделяли в градиентном полиакриламидном геле 5–15 % (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на мембрану PVDF осуществляли электроослюющей в течение 50 минут [25].

Преинкубацию Western-блотов проводили в буфере TBS-T (с добавлением 1 % Tween-20) с 3 % (масса/объем) BSA в течение 1 часа. Затем мембраны инкубировали в присутствии первичных антител против PSD-95 в разведении 1:1000, против синаптофизина в разведении 1:5000, против Ki-67 в разведении 1:2000 в течение 1 ч при температуре 4°C . Затем после отмывки в буфере TBS-T (с добавлением 1 % Tween-20) с 0,5 % (масса/объем) BSA мембраны инкубировали в присутствии вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:750) в течение 45 минут. Детектирование белков осуществляли после отмывки от вторичных антител в буфере TBS-T (с добавлением 1 % Tween-20) с 0,5 % (масса/объем) BSA в реакции с ECL-реагентами (с использованием гель-документирующей системы Alliance UVITEC (Великобритания)). Денситометрию полученных изображений проводили с помощью программы и GIMP2.

Статистическая обработка / Statistical processing

Межгрупповые различия оценивали с помощью U-теста Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Терапевтический эффект ГСБ-106 оценивали по формуле: (значение параметра в группе «ОСМА+ГСБ-106» – значение параметра в группе «ОСМА») / (значение параметра в группе «л.о.» – значение параметра в группе «ОСМА») $\times 100$ %.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Дипептид ГСБ-106 снижает объем инфаркта мозга / Dipeptide GSB-106 reduces the volume of brain infarction

У ишемизированных животных выявлена выраженная зона инфаркта в правом полушарии, включающая кору и стриатум, которая составляла в среднем $792 \pm 89 \text{ мм}^3$. ГСБ-106 снижал объем повреждения мозга до $602 \pm 89 \text{ мм}^3$ (на 24 %) ($p < 0,05$) (рис. 2).

Ранее было показано, что ГСБ-106 снижает объем ишемического повреждения в тех же условиях на 60 % при начале введения через 4 ч после операции [13]. Эффект ГСБ-106 при начале его введения через 24 ч после операции был значительно менее выраженным. По-видимому, это связано с тем, что к 12 часам после начала ишемии формирование зоны инфаркта

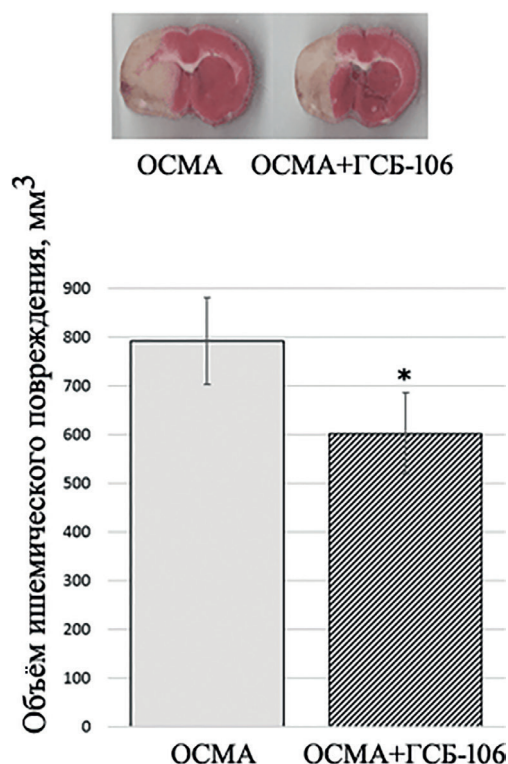


Рис. 2. ГСБ-106 снижает объем инфаркта мозга после ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс

Fig. 2. GSB-106 reduces the volume of cerebral infarction after ischemic stroke caused by transient occlusion of the middle cerebral artery in rats

Примечания: ГСБ-106 вводили в дозе 0,1 мг/кг, в/б, через 24 ч после операции и затем 1 раз в сутки в течение 6 дней; Объем инфаркта мозга определяли с помощью морфометрии срезов, окрашенных TTC, на 7-е сутки после операции; Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего; * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «ОСМА» (U-тест Манна-Уитни).

Notes: GSB-106 was administered at a dose of 0.1 mg / kg, intraperitoneal, 24 hours after surgery and then once a day for 6 days; The volume of brain infarction was determined using morphometry of sections stained with TTC on the 7th day after surgery; The data is presented in the form of averages and standard errors of the mean; * – $p < 0.05$ compared to the "MCAO" group (U-Mann-Whitney test).

практически завершено [21], и в этих условиях роль нейропротекции в снижении объёма ишемического повреждения незначительна. Мы предполагаем, что активность ГСБ-106 в данном случае обусловлена нейрорегенеративными свойствами дипептида.

Дипептид ГСБ-106 восстанавливает нарушенный нейрогенез в гиппокампе и стриатуме / Dipeptide GSB-106 restores impaired neurogenesis in the hippocampus and striatum

У ишемизированных нелеченых животных иммунореактивность к маркеру пролиферации Ki-67 по сравнению с ложнооперированными животными была снижена ($p < 0,05$) в гиппокампе и стриатуме повреждённого полушария на 29 и 33 %, соответственно (в гиппокампе: «л.о.» — $6,3 \pm 0,6$ О.Д.Е., «ОСМА» — $4,5 \pm 0,5$ О.Д.Е.; в стриатуме: «л.о.» — $3,6 \pm 0,4$ О.Д.Е., «ОСМА» — $2,4 \pm 0,2$ О.Д.Е.). Это свидетельствует об угнетении нейрогенеза (и/или глиогенеза) в этих областях (рис. 3). Дипептид ГСБ-106 восстанавливал иммунореактивность к Ki-67 как в гиппокампе (до $6,6 \pm 0,5$ О.Д.Е.), так и в стриатуме (до $3,4 \pm 0,2$ О.Д.Е.), с терапевтическим эффектом, соответственно, 117 и 83 % ($p < 0,05$) (см. рис. 3).

Дипептид ГСБ-106 восстанавливает нарушенный синаптогенез / The GSB-106 dipeptide restores impaired synaptogenesis

Иммунореактивность к синаптическим маркерам синаптофизину и PSD-95 была статистически значимо ($p < 0,05$) снижена в повреждённом стриатуме у ишемизированных животных по сравнению с ложнооперированными (на 32 и 26 %, соответственно) (синаптофизин: $10,3 \pm 2,3$ О.Д.Е. — в группе «л.о.» и $7,0 \pm 0,9$ О.Д.Е. — в группе «ОСМА»; PSD-95: $3,5 \pm 0,9$ О.Д.Е. — в группе «л.о.» и $2,6 \pm 0,4$ О.Д.Е. — в группе «ОСМА») (рис. 4), что свидетельствует о снижении количества синапсов в этой области. ГСБ-106 полностью восстанавливал иммунореактивность к синаптофизину (до $12,3 \pm 2,3$ О.Д.Е., терапевтический эффект 160 %) и PSD-95 (до $4,7 \pm 0,4$ О.Д.Е., терапевтический эффект 233 %) (см. рис. 4).

Известно, что BDNF является одним из ключевых факторов регуляции нейрогенеза во взрослом мозге. Он стимулирует пролиферацию нейрональных стволовых клеток, дифференцировку и миграцию нейробластов и способствует их выживаемости [26–28]. В ряде работ показана стимуляция нейрогенеза под действием BDNF в условиях экспериментальной церебральной ишемии. Так, на модели ишемического инсульта, вызванного фототромбозом сосудов префронтальной коры головного мозга у крыс, BDNF при внутривенном субхроническом введении стимулировал гиппокампальный нейрогенез и миграцию нейробластов из субвентрикулярной зоны по направлению к повреждённой коре [7]. Сходные эффекты BDNF были получены на модели ишемического инсульта у

крыс, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии [8]. На этой модели генная BDNF-терапия приводила к значительному увеличению уровней BrdU-позитивных клеток и мигрирующих нейробластов в субвентрикулярной зоне через неделю после операции, а через 4 недели после операции — к

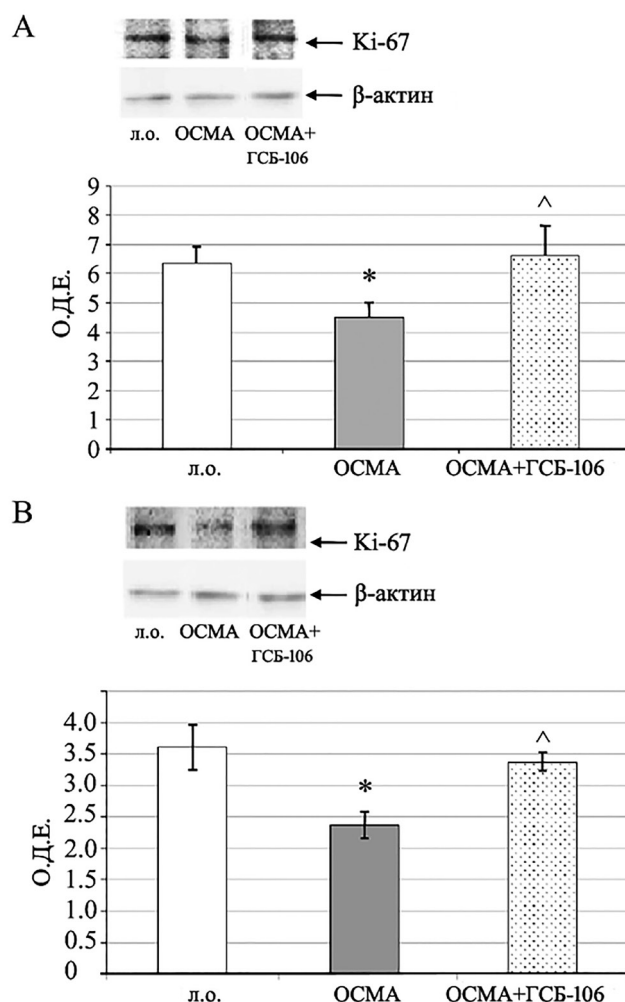


Рис. 3. Дипептид ГСБ-106 восстанавливает иммунореактивность к Ki-67 в гиппокампе (А) и стриатуме (Б) повреждённого полушария после ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс

Fig. 3. GSB-106 dipeptide restores immunoreactivity to Ki-67 in the hippocampus (А) and striatum (Б) of the damaged hemisphere after ischemic stroke caused by transient occlusion of the middle cerebral artery in rats

Примечания: ГСБ-106 вводили в дозе 0,1 мг/кг, в/б, через 24 ч после операции и затем 1 раз в сутки в течение 6 дней; О.Д.Е. — относительные денситометрические единицы; Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений; * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «л.о.»; ^ — $p < 0,05$ по сравнению с группой «ОСМА» (U-тест Манна–Уитни).

Notes: GSB-106 was administered at a dose of 0.1 mg / kg, intraperitoneal, 24 hours after surgery and then once a day for 6 days; R.D.U. — relative densitometric units; Data are presented in the form of averages and standard deviations; * — $p < 0.05$ compared with the "sham" group; ^ — $p < 0.05$ compared with the "MCAO" group (U-Mann–Whitney test).

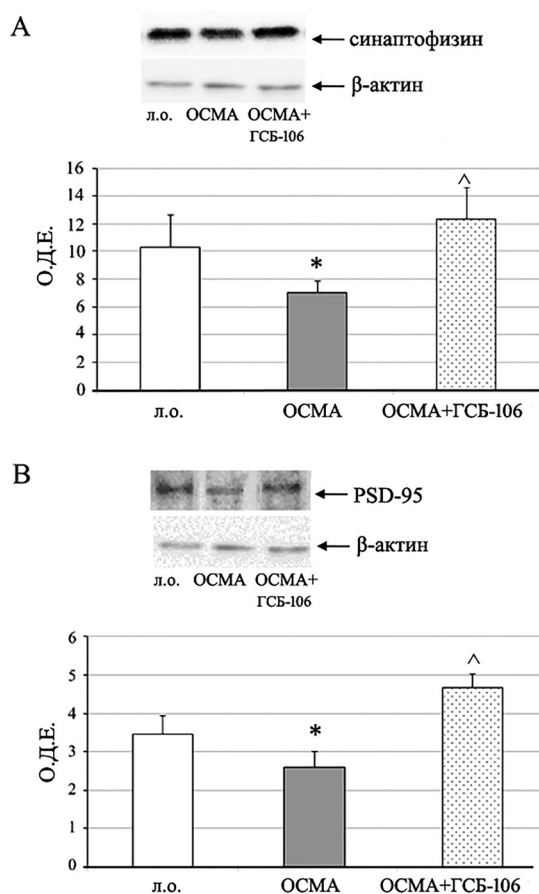


Рис. 4. Дипептид ГСБ-106 увеличивает иммунореактивность к синаптическим маркерам синатофизину (А) и PSD-95 (Б) в стриатуме повреждённого полушария после ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс

Fig. 4. Dipeptide GSB-106 increases immunoreactivity to synaptic markers synaptophysin (A) and PSD-95 (B) in the striatum of the damaged hemisphere after ischemic stroke caused by transient occlusion of the middle cerebral artery in rats

Примечания: ГСБ-106 вводили в дозе 0,1 мг/кг, в/б, через 24 ч после операции и затем 1 раз в сутки в течение 6 дней; О.Д.Е. — относительные денситометрические единицы; Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений; * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «л.о.»; ^ — $p < 0,05$ по сравнению с группой «ОСМА» (U-тест Манна–Уитни).

Notes: GSB-106 was administered at a dose of 0.1 mg / kg, intraperitoneal, 24 hours after surgery and then once a day for 6 days; R.D.U. — relative densitometric units; Data are presented in the form of averages and standard deviations; * — $p < 0.05$ compared with the "sham" group; ^ — $p < 0.05$ compared with the "MCAO" group (U-Mann–Whitney test).

увеличению количества вновь образовавшихся нейронов на границе зоны ишемического повреждения по сравнению с активным контролем [8]. Стимуляция нейрогенеза в условиях церебральной ишемии установлена и для низкомолекулярного миметика BDNF N,N',N'-tris (2-hydroxyethyl)-1,3,5-benzene tricarboxamide (LM22A-4), который активирует TrkB рецепторы и их PI3K/АКТ и MAPK/ERK сигнальные пути [11]. Соединение LM22A-4 при хроническом интраназальном введении мышам после односторон-

ней окклюзии общей сонной артерии с последующей гипоксией через неделю после операции увеличивало уровни пролиферирующих клеток и мигрирующих нейробластов в субвентрикулярной зоне, а через 6 и 10 недель после операции — количество вновь образовавшихся нейронов в прилегающих к ишемическому повреждению областях коры и стриатума.

В настоящем исследовании дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 восстанавливал сниженную иммунореактивность к Ki-67 в гиппокампе и стриатуме ишемизированных животных с терапевтическими эффектами 117 и 83 %, соответственно. Исходя из данных литературы, можно предположить, что дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 в условиях экспериментального ишемического инсульта стимулирует нейрогенез в гиппокампе и стриатуме повреждённого полушария.

Роль BDNF в регуляции синаптогенеза хорошо изучена. BDNF стимулирует рост и ветвление аксонов и дендритов и формирование синапсов [29] как на пре-, так и на постсинаптическом уровнях [30, 31]. Показано, что BDNF стимулирует синаптогенез в условиях ишемического повреждения мозга. Так, на модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс BDNF, доставленный в повреждённое полушарие с помощью генной терапии, способствовал полному восстановлению на 7-е сутки после операции уровня синатофизина, сниженного у ишемизированных и не получавших BDNF животных [4]. Сходный эффект был получен для дипептида ГСБ-106 в отношении не только синатофизина, но и постсинаптического маркера PSD-95.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что миметик BDNF ГСБ-106, как и нативный нейротрофин, стимулирует синаптогенез в условиях церебральной ишемии.

Закключение / Conclusion

Таким образом, димерный дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 проявляет нейрорегенеративные свойства в условиях клинически значимого терапевтического окна (24 ч) на модели ишемического инсульта, предположительно за счёт стимуляции нейрогенеза и синаптогенеза. Выявленные эффекты свидетельствуют о перспективности дипептида ГСБ-106 в качестве потенциального лекарственного средства для лечения постинсультного состояния.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (Проект № 18-15-00381).

Financing. The work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 18-15-00381).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Поварнина Полина Юрьевна*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: povarnina@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN-код: 5498-6724

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

Povarnina Polina Yu.*Corresponding author*

e-mail: povarnina@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3278-8915>

SPIN code: 5498-6724

PhD Biological Sci., Senior research scientist of the Laboratory of peptide bioregulators of the Department of medicinal chemistry FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Антипова Татьяна Алексеевна

e-mail: zenina_tatyana@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9309-4872>

SPIN-код: 7723-6008

к. б. н., заведующая лабораторией фармакологии нейропротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Antipova Tatyana A.

e-mail: zenina_tatyana@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9309-4872>

SPIN code: 7723-6008

PhD Biological Sci., Head Neuroprotection pharmacology laboratory, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Логвинов Илья Олегович

e-mail: logvinov_ilya@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6101-1035>

SPIN-код: 9909-9630

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

Logvinov Ilya O.

e-mail: logvinov_ilya@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6101-1035>

SPIN code: 9909-9630

Research Scientist, Neuroprotection pharmacology laboratory FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Никифоров Дмитрий Михайлович

e-mail: mrdmwriter@gmail.com

SPIN-код: 7028-8335

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

Nikiforov Dmitriy M.

e-mail: mrdmwriter@gmail.com

SPIN code: 7028-8335

Junior research scientist of the Laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E et al. BDNF: A key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol.* 2018;38(3):579–593. DOI: 10.1007/s10571-017-0510-4.
2. Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev.* 2012;64(2):238–258. DOI: 10.1124/pr.111.005108.
3. Stanne TM, Aberg ND, Nilsson S et al. Low circulating acute brain-derived neurotrophic factor levels are associated with poor long-term functional outcome after ischemic stroke. *Stroke.* 2016;47(7):1943–1945. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.012383.
4. Zhang Y, Qiu B, Wang J et al. Effects of BDNF-transfected BMSCs on neural functional recovery and synaptophysin expression in rats with cerebral infarction. *Mol Neurobiol.* 2017;54(5):3813–3824. DOI: 10.1007/s12035-016-9946-7.
5. Yu S-J, Tseng K-Y, Shen H et al. Local administration of AAV-BDNF to subventricular zone induces functional recovery in stroke rats. *PLoS One.* 2013;8(12):e81750. DOI: 10.1371/journal.pone.0081750.
6. Han Q, Li B, Feng H, et al. The promotion of cerebral ischemia recovery in rats by laminin-binding BDNF. *Biomaterials.* 2011;32(22):5077–5085. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.072

7. Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke.* 2007;38(7):2165–2172. DOI: 10.1161/STROKEAHA.106.477331.
8. Jeong CH, Kim SM, Lim JY et al. Mesenchymal stem cells expressing brain-derived neurotrophic factor enhance endogenous neurogenesis in an ischemic stroke model. *Biomed Res Int.* 2014;2014. DOI: 10.1155/2014/129145.
9. Fletcher JM, Hughes RA. Modified low molecular weight cyclic peptides as mimetics of BDNF with improved potency, proteolytic stability and transmembrane passage *in vitro*. *Bioorganic Med Chem.* 2009;17(7):2695–2702. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.02.053.
10. Zhao S, Yu A, Wang X et al. Post-Injury Treatment of 7,8-Dihydroxyflavone Promotes Neurogenesis in the Hippocampus of the Adult Mouse. *J Neurotrauma.* 2016;33(22):2055–2064. DOI: 10.1089/neu.2015.4036.
11. Han J, Pollak J, Yang T, et al. Delayed administration of a small molecule TrkB ligand promotes recovery after hypoxic- ischemic stroke. *Stroke.* 2012;43(7):1918–1924. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.641878.
12. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора. *Биоорганическая химия.* 2012;38(3):280–290. [Gudasheva TA, Tarasyuk AV, Pomogaibo SV et al. Design

and synthesis of dipeptide mimetics of the brain-derived neurotrophic factor. *Russ J Bioorg Khim.* 2012;38(3):280–290. (In Russ.). DOI: 10.1134/S1068162012030053.

13. Gudasheva TA, Povarnina P, Logvinov IO et al. Mimetics of brain-derived neurotrophic factor loops 1 and 4 are active in a model of ischemic stroke in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:3545–3553. DOI: 10.2147/DDDT.S118768.

14. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В. и др. Дипептидные миметики отдельных петель NGF и BDNF активируют PLC- γ 1. Доклады РАН. *Науки о жизни.* 2020;494(1):486–490. DOI: 10.31857/S2686738920050133. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Nikolaev S et al. Dipeptide mimetics of different NGF and BDNF loops activate PLC- γ 1. *Dokl Biochem Biophys.* 2020;494(1):244–247 (In Russ). DOI: 10.1134/S1607672920050075.].

15. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 активирует TrkB, Erk, Akt и способствует выживаемости нейронов *in vitro*. Доклады Академии наук. 2013;451(5):577. DOI: 10.7868/S0869565213240250. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Antipova TA, Seredenin SB. Brain-derived neurotrophic factor loop 4 dipeptide mimetic GSB-106 activates TrkB, Erk, and Akt and promotes neuronal survival *in vitro*. *Dokl Biochem Biophys.* 2013;451:212–214. (In Russ). DOI: 10.1134/S1607672913040121.].

16. Gudasheva TA, Povarnina P, Tarasiuk AV, Seredenin SB. The low molecular weight brain-derived neurotrophic factor mimetics with antidepressant-like activity. *Curr Pharm Des.* 2019;25(6):729–737. DOI: 10.2174/1381612825666190329122852.

17. Колыванов Г.Б., Жердев В.П., Грибакина О.Г. и др. Сравнительная доклиническая фармакокинетика и биодоступность таблетированной лекарственной формы антидепрессанта ГСБ-106. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2019;167(5):577–580. [Kolyvanov GB, Zherdev VP, Gribakina OG, et al. Comparative preclinical pharmacokinetics and bioavailability of antidepressant GSB-106 tablet form. *Bull Exp Biol Med.* 2019;167(5):637–640. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-019-04587-w.

18. Алексеева С.В., Сорокина А.В., Волкова А.В. и др. Исследование острой и хронической токсичности готовой лекарственной формы дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2019;(2):46–50. [Alekseeva SV, Sorokina AV, Volkova AV, Zabrodina VV, Miroshkina IA, Kachalov KS, Alekseev IV, Zaharov AD, Povarnina PYu, Durnev AD. The study of the acute and chronic toxicity dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 finished dosage form. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2019;(2):46–50. (In Russ.). DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10047.

19. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора предотвращает нарушение нейрогенеза у стрессированных мышей. *Бюллетень экспери-*

ментальной биологии и медицины. 2016;162(10):448–451. [Gudasheva TA, Povarnina PY, Seredenin SB. Dipeptide Mimetic of the Brain-derived Neurotrophic Factor Prevents Impairments of Neurogenesis in Stressed Mice. *Bull Exp Biol Med.* 2017;162(4):454–457. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-017-3638-9.

20. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 с антидепрессивной активностью стимулирует синаптогенез. Доклады Академии Наук. 2018;481(6):691–693. DOI: 10.31857/S086956520002110-4. [Gudasheva TA, Povarnina PY, Antipova TA, Seredenin SB. Dipeptide mimetic of the BDNF GSB-106 with antidepressant-like activity stimulates synaptogenesis. *Dokl Biochem Biophys.* 2018;481(1):225–227. (In Russ). DOI: 10.1134/S1607672918040130.].

21. McCullough LD, Liu F. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: Methods and potential pitfalls. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:464701. DOI: 10.1155/2011/464701.

22. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20(1):84–91. DOI: 10.1161/01.STR.20.1.84.

23. Bederson JB, Pitts L, Germano S, Nishimura M et al. Evaluation of 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke.* 1986;17(6):1304–1308. DOI: 10.1161/01.str.17.6.1304.

24. Alam A. A model for formulation of protein assay. *Anal Biochem.* 1992;203(1):121–126. DOI: 10.1016/0003-2697(92)90051-8.

25. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76(9):4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

26. Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Actions of brain-derived neurotrophin factor in the neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3650. DOI: 10.3390/ijms19113650.

27. Chiaramello S, Dalmasso G, Bezin L et al. BDNF/TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci.* 2007;26(7):1780–1790. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2007.05818.x.

28. Bath KG, Akins MR, Lee FS. BDNF control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Psychobiol.* 2012;54(6):578–589. DOI: 10.1002/dev.20546.

29. Mizui T. BDNF and Synaptic Plasticity: The Recent Cell Biology for Understanding of Brain Disorders. *Clin Pharmacol Biopharm.* 2013;S1:004. DOI: 10.4172/2167-065x.s1-004.

30. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol.* 2010;70(5):304–322. DOI: 10.1002/dneu.20765.

31. Tartaglia N, Du J, Tyler WJ et al. Protein Synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37585–37593. DOI: 10.1074/jbc.M101683200.

Применение метода *AlphaScreen* и *AlphaLisa* в разработке лекарственных препаратов и фармакокинетических исследованиях

Мухаметшина Р. Т., Копейн Д. С., Симонов В. М.

Акционерное Общество "ГЕНЕРИУМ", Владимирская область, Россия

Аннотация. Разработка лекарственных препаратов нуждается в высокотехнологичных, простых и чувствительных методах. Метод *AlphaLisa* является универсальным методом, который подходил бы под перечисленные критерии. Однако анализ работ по фармакокинетике лекарственных препаратов, имеющих отношение к данному методу, демонстрирует незначительное количество фармакокинетических исследований при клинических испытаниях. В данной статье мы раскрываем не только положительные стороны метода *Alpha*, но и его недостатки.

Ключевые слова: *AlphaLisa*; фармакокинетика; лекарственные препараты

Для цитирования:

Мухаметшина Р. Т., Копейн Д. С., Симонов В. М. Применение метода *AlphaScreen* и *AlphaLisa* в разработке лекарственных препаратов и фармакокинетических исследованиях. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1):44–54. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-44-54>

Поступила: 24 февраля 2022 г. **Принята:** 02 марта 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

Application of the *AlphaScreen* and *AlphaLisa* method in drug development and pharmacokinetic studies

Mukhametshina RT, Kopein SD, Simonov VM

Joint Stock Company "GENERIUM", Vladimir region, Russia

Abstract. Drug development requires high-tech, simple, and sensitive methods. *AlphaLisa* method was announced as a universal method that would fit the listed criteria. However, research of other works on the pharmacokinetics of drugs related to this method showed a small number of pharmacokinetic studies in clinical trials. In this review, we focused on not only the positive aspects of the *Alpha* method, but also its disadvantages.

Keywords: *AlphaLisa*; pharmacokinetics; medicinal products

For citations:

Mukhametshina RT, Kopein DS, Simonov VM. Application of the *AlphaScreen* and *AlphaLisa* method in drug development and pharmacokinetic studies. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):44–54. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-44-54>

Received: February 24, 2021. **Accepted:** March 02, 2022. **Published:** March 30, 2022

Список сокращений / List of abbreviations

AlphaLisa	Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay	Гомогенный иммунолюминесцентный анализ
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer	Биолюминесцентный резонансный перенос энергии
DELPHIA	Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay	Иммуноанализ диссоциации с усиленной флуоресценцией лантаноидов
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	Иммуноферментный анализ
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	Флуоресцентный резонансный перенос энергии
FLAG /HA/Myс/6xHis	Small tag	Низкомолекулярные метки
GCH	Glutation	Глутатион
GCP	Good clinical practice	Надлежащая клиническая практика
GLP	Good laboratory practice	Надлежащая лабораторная практика
GST	Glutathione-S-Transferase	Глутатион-трансфераза
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2	Рецептор эпидермального фактора роста 2
HTS	High throughput screening	Высокопроизводительный скрининг
IgG	Immunoglobulin G	Иммуноглобулин G
LOCI	Luminescent Oxygen Channeling Assay	Иммунолюминесцентный анализ, индуцируемый кислородом
MDM2/MDM4	Mouse double minute 2 homolog/mouse double minute 4 homolog	Двойной мышинный гомолог
Ni-NTA/poly-His	Nickel nitrilotriacetic acid/polyhistidine-tag	Полигистидиновые метки
PTMSELISA	ELISA sensitive to histone post-translational modifications	ИФА, специфичный к пост-трансляционным модификациям гистонов
RET	Resonance Energy Transfer	Резонансный перенос энергии
SCD	Sickle cell disease	Серповидно-клеточная анемия
TR-FRET	Time-resolved fluorescence energy transfer	Флуоресцентный резонансный перенос энергии с временным разрешением
TRF	Time – resolved fluorescence	Флуоресценция с временным разрешением
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Фактор роста (A) сосудов эндотелия

Введение / Introduction

Межмолекулярные взаимодействия биомолекул присущи каждому клеточному процессу. Любое перечисление основных тем исследований в биологии, например: репликация ДНК, транскрипция, трансляция, сплайсинг, секреция, контроль клеточного цикла, внутриклеточная передача сигнала (сигнальная трансдукция) и многое другое — также является перечислением процессов, в которых молекулярные комплексы вовлечены в качестве основных компонентов. Белки играют основную роль в таких взаимодействиях. Анализ взаимодействий белков в этих комплексах не является исключительной областью белковой биохимии. Другие области биологии, такие как генетика, клеточная биология, биология развития, и особенно молекулярная биология и биофизика практически полностью состоят из изучения и построения сетей взаимодействия биомолекул.

Разработка новых лекарственных препаратов не обходится без проведения доклинических и клинических исследований, соответственно раздел фармакокинетики также не остаётся без внимания. Литературные данные о том, что метод AlphaLISA является методом чувствительным/прецизионным, дают нам право предположить о его уникальности и возможном его использовании в доклинических и клинических исследованиях при разработке новых лекарственных препаратов. Соответственно, целью данного обзора является изучение возможностей и недостатков методов Alpha, а также роль данного метода и фактическое применение в фармакокинетических исследованиях.

Определения различных методик межмолекулярных взаимодействий / Definitions of various methods of intermolecular interactions

Технология захвата — методика для измерения взаимодействий между биомолекулами, включая белок-белковые взаимодействия [1], белок-нуклеиновые взаимодействия [2], пост-трансляционные модификации (фосфорилирование белков) [3], белок-лигандные взаимодействия [4] и специфичные аналиты (цитокины, гормоны). Методом сближения в растворе изучаются биомолекулы, включая белки или нуклеиновые кислоты, а также и низкомолекулярные лиганды [5].

Для сближения донорных и акцепторных компонентов могут использоваться различные подходы. Наиболее яркими примерами являются биотин/стрептавидин, глутатион (GSH) / глутатион-С-трансфераза (GST), никель-NTA/полигистидин (Ni-NTA/polyHis), FLAG/anti-FLAG, HA/anti-HA, Мус/anti-Мус и антитела [6]. Многие из этих систем используют специфические последовательности — таги, которые могут быть генетически спроектированы в рекомбинантные белки (например, 6xHis, GST, FLAG, Мус), делая

пост-трансляционные химические модификации необязательными [7].

При зарождении биохимии и молекулярной биологии биологические взаимодействия изучали, используя гетерогенные подходы, когда молекулу, с которой изучается взаимодействие, можно закрепить на подложке либо специфически выделить из раствора. В таких методах происходит инкубация с раствором, где содержатся предполагаемые молекулы для связывания, и требуется отмывка от несвязавшихся молекул. К таким методам относятся иммунореципитация, вестернблот, аффинная хроматография и пр. Такие классические подходы позволили выяснить и изучить многие фундаментальные взаимодействия, такие как строение молекулярных машин (например, рибосома или реплисома) или передачи внутри- и межклеточного сигнала в различных каскадах. Однако такие методы, где требуется изучить большое количество взаимодействий, малоприменимы. Другой подход состоит в том, чтобы изучать взаимодействия непосредственно в растворе без дополнительных манипуляций. Такие методы называют гомогенными, когда при взаимодействии между донором и акцептором возникает сигнал. Гомогенными методами сближения в растворе изучают биомолекулы, включая и макромолекулы, такие как белки или нуклеиновые кислоты, а также и низкомолекулярные лиганды [5].

Для детекции молекулярных взаимодействий в ряде систем в биологии и химии применяются техники на основе резонансного переноса энергии.

Резонансный перенос энергии (RET) — это безизлучательный перенос энергии от донора к акцептору, наблюдаемый только при их сближении на расстояние менее 10 нм. Для наблюдения *RET* также необходимо перекрытие спектра эмиссии донора со спектром поглощения акцептора, а также ориентация диполей донора и акцептора при этом не должна составлять угол 90°. На практике *RET* проявляется в изменении регистрируемого спектра испускания: уменьшении интенсивности испускания донора и появлении спектра испускания акцептора. В случае гибридизации молекулы донора с одним участником и молекулы акцептора с другим участником, появляется возможность изучения межмолекулярных, например, межбелковых взаимодействий в живых клетках. Также возможно изучение конформационных переходов в самой макромолекуле, если донор и акцептор локализованы на разных её концах, и расстояние между ними изменяется при конформационных перестройках. Соотношение интенсивности излучения акцептора к интенсивности излучения донора (*RET* сигнал) даёт возможность использования *RET* и для количественного анализа [8].

Общие типы гомогенных техник сближения с высокой пропускной способностью (HTS) включают: *FRET* (флуоресцентный резонансный перенос энергии), *BRET* (биолюминесцентный резонансный

перенос энергии), *TR-FRET* (разрешённый во времени флуоресцентный резонансный перенос энергии), Alpha (гомогенный иммунолюминесцентный анализ).

— Методика **FRET**

Методика *FRET* также известна как флуоресцентный резонансный перенос энергии. Это методика используется для изучения биомолекулярных конформаций и их динамики как в комплексе с другими молекулами [9], так и самостоятельно [10–13].

— Методика **BRET**

В работе *Vickers TA* [2] представлена разработка новой быстрой методики с высокой пропускной способностью. Методика основывается на биолюминесцентном резонансном переносе энергии, используя люциферазу *Nanoluc* (*Nluc*) [14, 15].

— Методика **TR-FRET**

Разрешённый во времени флуоресцентный резонансный перенос энергии — это техника на основе флуоресценции, которая блокирует анализ молекулярных взаимодействий в биохимических процессах. Принцип *TR-FRET* основывается на флуоресценции с временным разрешением (*TRF*) для измерения и флуоресценции резонансного переноса энергии между донорным и акцепторным частицами. Метод *TR-FRET* широко применяется для изучения киназной активности, белок-белковых взаимодействий, клеточных сигнализаций [16].

— Основы метода **Alpha** (*AlphaScreen*, *AlphaLISA*, *AlphaPLEX*)

В основе метода *Alpha* лежит хемилюминесценция, где синглетный кислород, генерируемый высокоэнергетическим облучением донорных частиц, диффундирует к акцепторным частицам. Синглетный кислород чрезвычайно нестабилен и может диффундировать на ограниченное расстояние около 200 нм. При сближении частиц синглетный кислород попадает в акцепторные частицы, что приводит к возбуждению каскадной серии химических реакций, в конечном счёте вызывая генерацию хемилюминесцентного сигнала. Молекулы, между которыми изучается взаимодействие, иммобилизуются на поверхности донорных и акцепторных частиц (рис. 1). Такой подход,

как технология на основе *FRET*, позволяет изучать взаимодействие молекул напрямую, без стадий отмывки, в отличие от многих других технологий (например, как ИФА). Благодаря этому технология *Alpha* использует протокол гомогенного состава, в котором время и количество операций при проведении анализа значительно уменьшаются.

Технология *Alpha* включает в себя методы *AlphaLISA*, *AlphaScreen* и *AlphaPlex*. Отличие между этими тремя технологиями состоит в различных наборах акцепторных частиц. К методу *AlphaScreen* относят акцепторные частицы, которые содержат красители — тиоксен, антрацен, рубрен. Рубрен излучает свет в диапазоне 520–620 нм. К методу *AlphaLISA* относят акцепторные частицы, содержащие хелатированный европий. Последний возбуждается светом с длиной волны 340 нм, возникающий в результате превращения тиоксена в производное дикетона после его реакции с синглетным кислородом.

Возбуждённый хелат европия генерирует интенсивный свет, обнаруживаемый в гораздо более узком диапазоне длин волн с максимумом около 615 нм. Реагенты *AlphaPlex* позволяют регистрировать сигнал длиной 545 нм (частица—акцептор на основе тербия) или сигнал длиной 645 нм (частица—акцептор на основе самария). *AlphaPlex* позволяет детектировать несколько типов взаимодействий сразу.

История появления метода Alpha / The history of the Alpha method

Развитие технологии *Alpha* берёт начало от известного метода Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay (LOCI), или иммунолюминесцентный анализ, индуцируемый кислородом. В основе анализа лежит взаимодействие двух типов сферических микрочастиц (битсов). Один тип частиц (донор), при облучении светом, продуцирует синглетный кислород, который в свою очередь является хромогенным субстратом для хемилюминесценции в акцепторном типе частиц [17].

Данный метод впервые был описан Эдвином Ульманом и его коллегами в 1994 году. В дальнейшем метод был запатентован и получил развитие в компании Perkin Elmer как технология *Alpha*.

В 2001–2003 годах были опубликованы работы, где была описана технология *Alpha* (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay). В работах измеряли концентрацию cAMP [18], и фосфорилирование AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) [19].

В дальнейшем при развитии метода технологию *Alpha* применяли для изучения транскрипционных факторов, киназ, однонуклеотидного полиморфизма (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) и прочее.

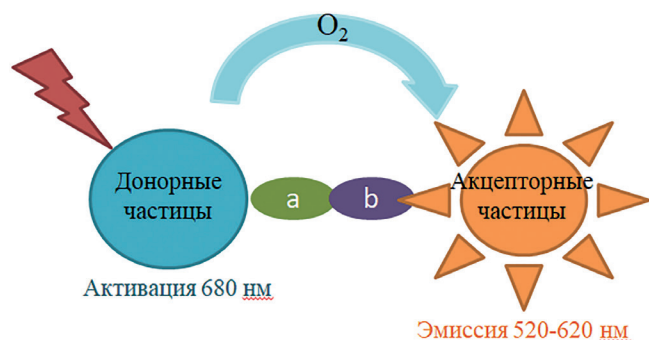


Рис. 1. Принцип работы метода *Alpha*

Fig. 1. The principle of operation of the *Alpha* method

Таблица 1

Сравнительная таблица (преимущества/недостатки методов)

Table 1

Comparative table (advantages/disadvantages of the methods)

Параметр /Метод	FP	Elisa/Delfia	FRET		AlphaScreen/AlphaLISA
Размер белка и/или комплекс	Меченый лиганд должен быть <1500 кDa и белок должен быть >10 000 Da	Без ограничений	Дистанция между донором и акцептором должна составлять не менее 9 нм		Дистанция между донором и акцептором должна составлять не менее 200 нм
Нижний предел чувствительности	nM; определяется с помощью Kd	До фемтограмм	Зависит от Kd, обычно 1–100 nM		До фемтограмм
Краситель	В основном органика флуоресцентные красители; предпочтительно красные (Alexa Fluor)	Лантаноиды (Delfia) или ферменты (пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза)	Донор: Al. Fluor 488 Al. Fluor 594 Европий Тербиум	Акцептор: Al. Fluor 555 Al. Fluor 647 XL665 Флюоресцеин	Донорные шарики производят синглетный кислород, который возбуждает акцепторные шарики с органическим или лантаноидным красителем
Дополнительные промывки	Нет	Да	Нет		Нет
Диапазон сигнала (высокий /низкий)	3–5 раз	4–5 порядков	<10 раз		2–3 порядка
Стоимость анализа	Низкая	Низкая	Средняя		Высокая
Примечания: * – фемтограммы – единица измерения массы, доляная по отношению к единице системы СГС грамму и единице системы СИ килограмму. 1 фг = 10-15 г = 10-18 кг. Notes: * – femtograms – a unit of mass measurement, divided in relation to the unit of the CGS system gram and the unit of the СИ system kilogram. 1 фг = 10-15 г = 10-18 кг.					
Arkin MR, 2012.Assay Guidance Manual					

Сравнение AlphaLISA с другими методиками / Comparison of AlphaLISA with other techniques

В исследованиях, проведенных учёным *Prabhu L* и его коллегами [20] было проведено сравнение методик *AlphaLISA* и *TR-FRET*, которое показало, что первая обладает большей чувствительностью, меньшей изменчивостью, а также способна автоматизироваться для крупномасштабного скрининга.

Для визуализации сравнительных характеристик методов ниже приведена табл. 1.

В последние годы технология *Alpha* стала довольно популярной в связи с универсальностью для многих методов. Она является очень чувствительной и эффективной на значительных расстояниях между донорными и акцепторными частицами (200 нм, по сравнению с *TR-FRET* 10–20 нм). После сравнения методов *FRET*, *TR-FRET* и *AlphaScreen* *Glickman JF* и соавт.[21] были сделаны выводы о том, что метод *AlphaScreen* обладает максимальной чувствительностью и динамическим диапазоном.

Этот анализ является простым, быстрым и более применимым к высокопроизводительным системам анализа, по сравнению с обычными методами для идентификации белок-белковых взаимодействий.

Применение Alpha метода при разработке лекарственных средств / Application of the Alpha method in the development of medicines

Метод Alpha используется в исследованиях таких молекулярных взаимодействий, как белок–белок, белок–лиганд, ДНК/РНК–белок. Он позволяет изучать передачу сигнала в клетках, изучать состав и работу молекулярных машин, искать перспективные лекарственные молекулы и многое другое. В таких исследованиях принципиальна высокая пропускная способность метода [22].

Высокопроизводительный скрининг (HTS) также необходим для эффективного отбора ингибиторов на основе малых молекул против специфичных мишеней. Ингибиторы, идентифицированные с помощью данной технологии, служат не только бесценным инструментом для изучения важных мишеней в канцерогенезе, но также обеспечивают перспективными кандидатами для терапии многих других болезней. Идеальный скрининг с высокой пропускной способностью должен быть легко воспроизводимым, чувствительным, масштабируемым, экономически незатратным и, самое важное, эффективным [23].

Одним из примеров подавления опухолей при раковых заболеваниях являются деубиквитиназы или ДУБы. Деубиквитиназы связаны со многими болезнями человека, включая неврологические расстройства, опухолевые заболевания и вирусные инфекции, что делает их превосходными кандидатами для фармакологического вмешательства. Многие ДУБы — это мультидоменные белки, которые очень трудно получить рекомбинантным путём в достаточных количествах. В этой связи необходим метод, исключающий необходимость получения рекомбинантного белка и подбор физиологически релевантной среды. Такой метод мог бы ускорить разработку терапевтически эффективных препаратов.

Применение *Alpha* технологии в сочетании с активной меткой гемагглютинаина (НА) деубиквитиназы обеспечивает хорошую платформу для поиска малых молекул деубиквитиназных ингибиторов в клеточном лизате. Деубиквитиназа (UCHL-1 убиквитин С-концевая гидролаза-1) содержит С-концевую человеческую метку гемагглютинаина (НА), которая позволяет ему связываться с акцепторными гранулами *AlphaLISA*, покрытые анти-НА антителами. В присутствии же цистеина и малых молекул в активном центре деубиквитиназы — переноса синглетного кислорода не происходит. Малые молекулы, способные ингибировать мечение деубиквитиназы — уменьшают альфа-сигнал, что подтверждает рабочую схему для разработки низкомолекулярных ингибиторов для терапевтического вмешательства [24].

Другой пример разработки новой иммунной технологии с высокопроизводительным скринингом на основе метода *AlphaLISA* описана в работе Muneoka S и соавт. [25]. Авторы данной работы задались целью установить платформу скрининга для выделения моноклональных антител, которые направлены напрямую против интактных мембранных белков, экспрессируемых на поверхности клеток. Была разработана клеточная система *AlphaLISA* для обнаружения взаимодействия между антеникотининовыми рецепторами ацетилхолина и никотиновыми рецепторами ацетилхолина, экспрессирующиеся на клетках. В принципе, разработанный формат анализа может быть дополнительно применён для оценки антител, нацеленных на любые виды интактных рецепторов клеточной поверхности, такие как GPCR и ионные каналы, любых видов с подходящей комбинацией гранул и лигандов.

Методы *AlphaScreen/AlphaPlex* используются в основном при поиске новых фармакологических препаратов или при изучении взаимодействий между биомолекулами. *AlphaLISA* использует хелат европия с гораздо более узким спектром эмиссии в 605–623 нм, что позволяет использовать метод в сложных матрицах (например сыворотка или плазма крови), где есть вещества со спектром поглощения для *AlphaScreen/AlphaPlex*. Таким образом, *AlphaLISA* больше используется как метод для определения концентраций раз-

ных веществ, в том числе терапевтически значимых метаболитов или белков, инфекционных агентов и пр., а также для изучения различных заболеваний и фармакокинетических исследований новых препаратов.

Применение метода AlphaLISA при изучении различных заболеваний / Application of the AlphaLISA method in the study of various diseases

На сегодняшний день метод *AlphaLISA* применяется при изучении заболеваний, включающих рак [26], атеросклероз [27], нейродегенеративное заболевание, характеризующееся нарушением двигательного контроля (болезнь Паркинсона) [28] и клеточную лейкемию (лимфома) [29].

Одним из направлений является изучение белков, выступающих в роли опухолевых супрессоров. Так, в статье Xiong Y [30], описан метод на основе *AlphaLISA* для поиска ингибиторов взаимодействий между белком p53 и его негативно регулируемыми лигандами, например, такими как MDM2 и MDM4. Белок p53, как хранитель генома, играет важную роль в регуляции клеточного цикла, апоптоза и репарации ДНК, защищая клетки от различных клеточных стрессов, таких как гипоксия и повреждение ДНК [31, 32]. Поэтому неудивительно, что белок p53 тесно связан с возникновением и ростом опухоли человека.

Целью работы Nakahata S и его коллег [29] было создание универсального анализа *AlphaLISA* для выявления взаимодействий между белком p53 и его негативно-регулируемыми лигандами. Донорные и акцепторные частицы соединяли между собой с помощью иммобилизованных антител против His-тага и антител анти-p53 к белку p53-His, соответственно, на донорных и акцепторных частицах. Эти антитела через молекулу p53 формируют мостик между донорными и акцепторными частицами. Однако, если в растворе присутствуют такие белки, как MDM2, конкурирующие с анти-p53-антителом за взаимодействие с TAD-доменом p53, связь между акцепторными и донорными частицами пропадает. В качестве модельной системы были выбраны белки MDM2 и MDM4, так как данные белки являются онкогенами, вследствие негативной регуляции активности p53. При связывании ингибитора (например, нитулина) с MDM2 или MDM4, данные белки не смогут продолжать связываться с белком p53, и флуоресцентный сигнал будет восстанавливаться. Таким образом, в данном методе можно находить ингибиторы взаимодействий между онкогенными белками MDM2 или MDM4 и белком p53.

Ишемическая болезнь сердца также является одной из основной причин смертности, первопричиной которой является атеросклероз. В статье Yoshida Y и его коллег [27] было проанализировано содержание антитела bRPA2, специфичного к белку RPA2-132, в сыворотке от пациентов с ишемической болезнью/сахарным диабетом и по сравнению с сывороткой

здоровых доноров. Метод *AlphaLISA* был использован в данной работе для оценки уровня антител в сыворотке и показал статистически значимый более высокий уровень. Для этого в анализе использовали акцепторные гранулы, конъюгированные с иммуноглобулинами (G) человека и донорные гранулы конъюгированные с глутатионом. В результате данного исследования методом *AlphaLISA* было выявлено статистически значимые более высокие уровни антител у пациентов с ишемической болезнью сердца/сахарным диабетом по сравнению со здоровыми донорами.

Возможности метода AlphaLISA / Features of the AlphaLISA method

С помощью метода *AlphaLISA* могут быть разработаны несколько видов анализов:

1. Детекция и количественная характеристика нескольких молекул в различных образцах (биомаркеры в сыворотке или плазме, фосфорилирование внутриклеточных белков в клеточных суспензиях и выделение белков из клеточного супернатанта).
2. Характеристика возможных белок-белковых взаимодействий, особенно в больших комплексах.
3. Измерения активности ферментов.
4. Детекция полноразмерных вирусов (прокариот/эукариот).
5. Промышленные процессы (скрининг примесных белков в производстве), для оценки чистоты биотерапевтических препаратов (белки клеток хозяина и остаточный белок-А).
6. Анализы иммунногенности [33].
7. Характеристика специфичности терапевтических ингибиторов.

Использование технологии AlphaLISA в фармакокинетических исследованиях / The use of AlphaLISA technology in pharmacokinetic research

Создание новых лекарственных препаратов предполагает обязательное проведение фармакокинетических исследований. В настоящее время в ряде медицинских центров созданы специальные подразделения для проведения фармакокинетических исследований с целью решения прикладных медицинских задач. Главной задачей фармакокинетики является проведение научно-обоснованной эффективной и безопасной фармакотерапии. Фармакологические исследования проводятся на различных этапах создания лекарственных средств (рис. 2): на стадии доклинического экспериментального изучения на животных, при ограниченных и расширенных клинических испытаниях, а также после внедрения лекарственного средства в медицинскую практику.

Большое внимание при исследовании фармакокинетики новых препаратов следует уделить разработке чувствительного и специфического метода определе-



Рис. 2. Схема разработки лекарственных препаратов
Fig. 2. Drug development scheme

Примечание: <https://www.nebiolab.com/drug-discovery-and-development-process/>

Note: <https://www.nebiolab.com/drug-discovery-and-development-process/>

ния концентрации препарата в биологических пробах. Чувствительность в идеале должна обеспечивать возможность устойчиво и достоверно определять концентрации, по крайней мере, в 20 раз меньше, чем средние максимальные уровни, наблюдаемые после приёма однократной дозы. Специфичность метода необходима для чёткого определения неизменённого препарата в присутствии его метаболитов и эндогенных соединений. Для отработки специфичности метода необходима его проверка в экспериментах на животных после установления структуры основных метаболитов, а также проверка воспроизводимости результатов анализа *in vitro*, когда к интактной сыворотке крови добавляют препарат в разных концентрациях [34].

Так как метод *AlphaLISA* зарекомендовал себя как чувствительный метод, то его использование было бы логичным в диагностике лекарственных препаратов при использовании малых доз. Однако анализ работ по фармакокинетике лекарственных препаратов (Pharmapendium, Pubmed), имеющих отношение к данному методу показал, что количество фармакокинетических исследований при клинических испытаниях не превышало 10. В табл. 2 приведены данные клинических испытаний на основе метода *AlphaLISA*.

В лаборатории авторов обзора были разработаны две методики на основе *AlphaLISA* для оценки концентрации двух разных терапевтических моноклональных антител в доклинических и клинических испытаниях. Исследователям удалось достигнуть валидированный нижний предел количественного определения (НПКО) в образцах сыворотки крови крыс, который составил 160 пг/мл, а в сыворотке крови человека — 62,5 пг/мл [неопубликованные данные].

Таблица 2

Фармакокинетические исследования с использованием метода *AlphaLISA*

Table 2

Pharmacokinetic studies using the *AlphaLISA* method

Наименование / год	Описание лекарства	Дозировка / Способ введения / Стадии исследований	Характеристики
Кризанлизумаб (Crizanlizumab) 2019 Chemistry Review 761128/S-000 Part 04 PDF 1274k https://www.pharmapendium.com/browse/fda/Crizanlizumab/29903dd4d5e2fbd38ba4eaf1f8377408?query=alphalisa&includeSynonyms=true	Моноклональное антитело; предложено для лечения серповидно-клеточной анемии за счёт ингибирования опосредованных Р-селектином клеточных адгезивных взаимодействий	100 мг/10 мл (10 мг/мл) Внутривенное введение Метод AlphaLISA был разработан для детекции анти-SelG1 в сыворотке клинических исследований A2101(ФК, PD здоровые волонтеры) и A2201 (пациенты с SCD)	Метод Alphalisa в данном исследовании не был валидирован
Тепротумумаб (Teprotumumab) 2020 https://www.pharmapendium.com/browse/fda/Teprotumumab/5b9480da06771e53cb29ff8704e6a74d?query=alphalisa&includeSynonyms=true Summary Review 761143/S-000 PDF 3791k	Моноклональное антитело; инсулин подобный фактор роста (IGF-1R) ингибирует развитие тиреоидной офтальмопатии	10 мг/кг начальная доза, в последующем 20 мг/кг каждые 3 недели. Рекомендуемый курс терапии 8 введений Внутривенное введение	Находится на стадии валидации
Бевацизумаб (Bevacizumab) (схож с продуктом Авастин) 2017 Chemistry Review 761028/S-000 Part 01 PDF 347k	Моноклональное антитело, присоединяется к изоформам VEGFA, которые были идентифицированы как регуляторы физиологической, патологической неоваскуляризации развития, поддерживающие рост опухоли и метастазирование	100 мг/4 мл и 400 мг/16 мл Внутривенное введение	Валидирован метод для определения бевацизумаба, не использующий клетки, такой как антипролиферационный метод. Это позволяет значительно ускорить анализ
Секукинумаб (Secukinumab) 2015 https://www.pharmapendium.com/browse/fda/Secukinumab/87ddf2615188f51b1f3a3d3eeb2e5c6f?query=alphalisa&includeSynonyms=true Approval Package 125504/S-001 Part 06 PDF 1650k https://www.pharmapendium.com/browse/fda/Secukinumab/2b5bc7274221783476b42d6a86d480f2?query=alphalisa&includeSynonyms=true	Человеческое моноклональное антитело взаимодействует с Интерлейкином 17A (IL-17A), ингибируя взаимодействия с рецепторами, в последующем с высвобождением противовоспалительных цитокинов, хемокинов и медиаторов повреждённых тканей	150 мг – доза Внутривенное введение 52 недели испытаний, из которых доступны 12 недель исследований Всего 2751 пациентов получали Секукинумаб в течение, как минимум, 6 месяцев	Супернатанты культур (Человеческие фибробластоподобные синовиоциты), предварительно стимулированные TNF в комбинации с IL-17A, IL-17 A/F или IL-17 F секукинумабом, собирали после инкубации в ночь, и уровни MMP-3 определяли с помощью метода Alpha в анализе ELISA
Трастузумаб (Trastuzumab) 2019 https://www.pharmapendium.com/browse/fda/Trastuzumab/06fa09ff76ad05c720edd0137843224f?query=alphalisa&includeSynonyms=true	Рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело, производное ДНК, относится к IgG1, содержит рамочные регионы человека и комплементарно-определяющие регионы мышинных антител p185 HER2. Антитела селективно взаимодействуют с внеклеточным доменом белка-рецептора-2 к эпидермальному ростовому фактору человека (HER2) на поверхности злокачественных клеток и тормозят их пролиферацию	420 мг на флакон; Внутривенная инъекция Фаза I сравнительного фармакокинетического исследования (однократная доза в течение 8 недель); Фаза III сравнительная эффективность (54 недели активной терапии)	Валидирован метод для определения трастузумаба не использующий клетки, такой как антипролиферационный метод. Это позволяет значительно ускорить анализ [35]

Наименование / год	Описание лекарства	Дозировка / Способ введения / Стадии исследований	Характеристики
Инфликсимаб (Infliximab) 2015	Моноклональное антитело, состоящее из вариабельной (Fv) области высокоаффинных нейтрализующих мышиных моноклональных антител к фактору некроза опухоли-альфа и фрагмента молекулы IgG1 человека	100 мг лиофилизата инфликсимаба восстановленный в 15 мл флаконе для инъекций Внутривенная инъекция	TRPT-030698 квалификация TP-001698 FcGammaRIA присоединение с помощью метода AlphaLISA для ABP710 и инфликсимаба. Результаты подтверждают то, что метод AlphaLISA подходит для оценки диапазона привязывания (присоединения) [35]
Адалимумаб (Adalimumab) 2016	Рекомбинантное моноклональное антитело, пептидная последовательность которого идентична IgG1 человека. Препарат используется для лечения ревматоидного артрита, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Крона, язвенного колита, псориаза, гнойного аденита, увеита и ювенильного идиопатического артрита. Адлимумаб является селективным иммунодепрессантом	Фармакокинетическое сходство — однократная доза (40 мг) Идентификационный номер исследования-20120262 Сравнительные клинические исследования — III фаза — каждую неделю (40 мг) Продолжительность курса — 26 недель Идентификационный номер исследования-20120262 Сравнительные клинические исследования — III фаза — первый день первой недели — 80 мг, затем 40 мг со второй недели, каждую неделю Продолжительность курса — 52 недели Идентификационный номер исследования — 20120263	

В ходе исследований при разработке метода были отмечены важные аспекты, которыми являются подбор условий сорбции частиц (антигенов, антител), выбор соотношения испытуемой матрицы (сыворотки, плазмы крови и пр.) к количеству реакционной смеси (суспензии частиц). Кроме того, проведённые эксперименты показали влияние состава буфера для разведения матрицы на неспецифическую агрегацию частиц. Немаловажным фактором для получения достоверного результата является и оптимизация температуры, времени инкубации на различных стадиях реакции и пробоподготовки.

В сравнении с другими высокочувствительными иммунологическими методами чувствительность *AlphaLISA* достигает фемтомолярных концентраций и сравнима с чувствительной ИФА (High Sensitivity

ELISA), при этом уступая методам на основе электрохемилюминисценции (ECL, V-plex™) или флуоресцентным методам на отдельных частицах на 1–2 порядка (Simoa, Erenna) [36].

Дискуссия / Discussion

Методы семейства *Alpha* — группа методов изучения межмолекулярных взаимодействий, успешно используемых в разных областях (изучение внутриклеточных взаимодействий, медицинская диагностика, эпидемиология, разработка лекарственных средств) как более быстрая и производительная, не требующая стадии отмывки альтернатива ИФА. Главным преимуществом *AlphaLISA* является возможность

автоматизации и миниатюризации метода за счёт небольшого числа стадий, возможности гомогенного протокола, небольшого объёма образца и широкого аналитического диапазона. Метод используется для создания быстрых скрининговых систем, в том числе полностью роботизированных. Ниже перечислены достоинства и недостатки методов *Alpha*.

**Положительные качества метода AlphaLISA /
Positive qualities of the AlphaLISA method:**

1. Малое количество образца, необходимого для анализа;
2. Широкий диапазон измеряемых концентраций;
3. Сравнимая или более высокая чувствительность, до 10 раз выше по сравнению с аналогичным методом ИФА;
4. Отсутствие стадии отмывки от несвязавшихся компонентов исключает необходимость использования промывочных станций (вошеров) и, как следствие, хорошая масштабируемость для большого количества образцов при использовании роботизированных станций.

Недостатки AlphaLISA в диагностических исследованиях и фармакокинетике / Disadvantages of AlphaLISA in diagnostic studies and pharmacokinetics:

1. Специализированное, дорогостоящее оборудование (спектрофотометр с фильтрами определённой длины волны);
2. Стоимость и доступность реактивов;
3. Временные затраты для подбора условий и валидации метода;
4. Отсутствие стадии отмывки, с другой стороны, приводит к тому, что компоненты матрицы, тем не менее, могут отрицательно влиять на чувствительность метода, как в случае работы с сывороткой, что приводит к длительному подбору условий и концентраций компонентов для достижения хорошей чувствительности и воспроизводимости;
5. В фармакокинетических исследованиях клинических испытаний зачастую не приводятся характеристики использования данного метода, что указывает на существование проблем в воспроизведении данного метода;
6. Фоточувствительные компоненты.

Анализ по применению данного метода в клинических испытаниях показывает небольшое количество фармакокинетических исследований терапевтических биопрепаратов. Учитывая тот факт, что с каждым годом требования, установленные GLP / GCLP и GCP, к биоаналитическим методам становятся все строже, далеко не каждый метод, использующийся в научных исследованиях, может быть применим и валидирован в клинических исследованиях.

ИФА как классический метод используется более 40 лет в фармакокинетических исследованиях. Однако

ИФА часто требует большого количества образца, плохо масштабируем и более продолжителен по времени проведения анализа вследствие гетерогенного подхода. Несомненно, классические методы, такие как ИФА, для исследования фармакокинетики имеют преимущество т. к. метод хорошо изучен, есть инструментальная база для работы с ИФА в большом количестве лабораторий. Однако там, где существуют ограничения ИФА, следует применять более чувствительные, производительные методы или основанные на других физико-химических подходах.

Валидированные методы *AlphaLISA* применяются в анализе фармакодинамики различных биологических маркеров в доклинических и клинических исследованиях [37]. Для *AlphaLISA* разработаны методы для определения TNF α [38], CD80 [39], цитокинов (IL2, IL6, IL17) [36, 37], иммуноглобулинов G1 и G4 классов [40–42], интерферон гамма [43] и много другое. Это свидетельствует о том, что для известных аналитов метод AlphaLISA хорошо валидируется и разработанные наборы пользуются популярностью.

Заключение / Conclusion

Как и в любой технологии, в методе *Alpha* существуют свои преимущества и ограничения. Основными недостатками данной технологии является фоточувствительность, влияние компонентов матрицы (например, поглощение синглетного кислорода), трудности с разработкой и валидацией метода. Основные преимущества этой технологии заключаются в том, что она применима к очень широкому спектру анализируемых веществ. Методика имеет возможность использовать маленькие количества образца и применять гомогенные, быстрые и чувствительные протоколы, в отличие от классических методов иммуноанализа. Кроме того, *Alpha* технологии не требуют введения больших флуоресцентных меток, которые могут стерически препятствовать биомолекулярным взаимодействиям.

Методы *Alpha* широко используются для обнаружения новых кандидатов для терапевтических препаратов, изучения межбелковых взаимодействий и многое другое, где требуется скринировать большое количество молекул на взаимодействие.

Несмотря на некоторые недостатки, *AlphaLISA* ограниченно используется в фармакокинетических исследованиях. *AlphaLISA* применяют для рутинных анализов в фармакодинамических исследованиях биологических и терапевтических маркеров, где разработанная методика может быть валидирована согласно требованиям регуляторов, и при наличии приборной базы стоимость одного анализа становится конкурентоспособной при сохранении высокой чувствительности количественных методов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. Мухаметшина Р.Т. — написание основного текста, редактирование; Копеин Д.С. — написание части текста, редактирование; Симонов В.М. — редактирование.

Participation of authors. Mukhametshina RT — writing the main text, editing; Kopein DS — writing part of the text, editing; Simonov VM — editing.

Благодарности. Выражаем благодарность за помощь в техническом редактировании обзора — Лягоскину И.В., Пантюшенко М.С., Лисицыной О.М., Аббасовой С.Г.

Acknowledgements. We express our gratitude for the help in the technical editing of the review — Lyagoskin IV, Pantyushenko MS, Lisitsyna OM, Abbasova SG.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Мухаметшина Регина Талгатовна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: rtmukhametshina@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6170-5221>

к. б. н., м. н. с. АО «ГЕНЕРИУМ»,
Владимирская область, Россия

Mukhametshina Regina T.

Corresponding author

e-mail: rtmukhametshina@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6170-5221>

PhD Biological Sci., junior researcher,
JSC «GENERIUM», Vladimir region, Russia

Копеин Дамир Сергеевич

e-mail: kopein@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1176-5829>

к. б. н., н. с. АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская
область, Россия

Kopein Damir S.

e-mail: kopein@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1176-5829>

PhD Biological Sci., research scientist,
JSC «GENERIUM», Vladimir region, Russia

Симонов Владимир Михайлович

e-mail: simonov@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0879-5595>

с. н. с. АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская
область, Россия

Simonov Vladimir M.

e-mail: simonov@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0879-5595>

senior researcher JSC «GENERIUM», Vladimir
region, Russia

Список литературы / References

1. Waller H, Chatterji U, Gallay P et al. The use of AlphaLISA technology to detect interaction between hepatitis C virus encoded NS5A and cyclophilin A. *J Virol Methods*. 2010;165(2):202–210. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.01.020.
2. Vickers TA, Crooke ST. Development of a Quantitative BRET affinity assay for nucleic acid-protein interactions. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161930. DOI: 10.1371/journal.pone.0161930.
3. Guenat S, Rouleau N, Biemann C et al. Homogeneous and nonradioactive high-throughput screening platform for the characterization of kinase inhibitors in cell lysates. *J Biomol Screen*. 2006;11(8):1015–1026. DOI: 10.1177/1087057106294697.
4. Гильмиярова Ф.Н., Рыскина Е.А., Колотьева Н.А., Потехина В.И., Горбачева И.В. Белок-лигандные взаимодействия: влияние минорных компонентов метаболизма. *Siberian Med Rev*. 2017;(6):12–21. [Gylmiyarova FN, Ryskina EA, Kolotieva NA, Potekhina VI, Gorbacheva IV. Protein-ligand interactions: the influence of minor components of metabolism. *Siberian Med Rev*. 2017;(6):12–21. (In Russ).]. DOI: 10.20333/2500136-2017-6-12-21.
5. Coussens NP, Auld D, Roby P et al. Compound-mediated assay interferences in homogenous proximity assays. *Assay Guidance Manual*. 2020; NBK553584.
6. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci*. 2013;73:9.1-9.9.23. DOI: 10.1002/0471140864.ps.0909s73.
7. Fairhead M, Howarth M. Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. *Methods Mols Biol*. 2015;1266:171–184. DOI: 10.1007/978-1-4939-2272-7_12.

8. Смирнова Д.В. Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светляков *Luciola Mingrelia* и их биоаналитическое применение. Диссертация на соискание ученой степени. Хим. факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова. — Москва; 2015. [Smirnova DV. Gibrindnye belki i kon'yugaty na osnove lyutsiferazy svetlyakov *Luciola Mingrelia* i ikh bioanaliticheskoe primeneniye. Dissertatsiya na soiskanie uchenoi stepeni. Khim. fakul'tet, MGU im. M.V. Lomonosova. Moscow; 2015. (In Russ).].
9. Mekler V, Kortkhonja E, Mukhopadhyay J et al. Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell*. 2002;108(5):599–614. DOI: 10.1016/S0092-9674(02)00667-0.
10. Ha T, Enderle T, Ogletree DF et al. Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(13):6264–6268. DOI: 10.1073/pnas.93.13.6264.
11. Kalinin S, Peulen T, Sindbert S et al. A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling. *Nat Methods*. 2012;9(12):1218–1225. DOI: 10.1038/nmeth.2222.
12. Hellenkamp B, Wortmann P, Kandzia F et al. Multidomain structure and correlated dynamics determined by self-consistent FRET Networks. *Nat Methods*. 2017;14(2):174–180. DOI: 10.1038/nmeth.4081.
13. Hellenkamp B, Schmid S, Doroshenko O et al. Precision and accuracy of single-molecule FRET measurements—a multi-laboratory benchmark study. *Nat Methods*. 2018;15(9):669–676. DOI: 10.1038/s41592-018-0085-0.
14. Machleidt T, Woodroffe CC, Schwinn MK et al. NanoBRET—a novel BRET platform for the analysis of protein–protein interactions. *ACS Chem Biol*. 2015;10(8):1797–1804. DOI: 10.1021/acscchembio.5b00143.

15. Wang J, Ren J, Wu B et al. Activation of Rab8 guanine nucleotide exchange factor Rabin8 by ERK1/2 in response to EGF signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(1):148–153. DOI: 10.1073/pnas.1412089112.
16. Ergin E, Dogan A, Parmaksiz M et al. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) assays for biochemical processes. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(14):1222–1230. DOI: 10.2174/1389201017666160809164527.
17. Ullman EF, Kirakossian H, Singh S et al. Luminescent oxygen channeling immunoassay: Measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(12):5426–5430. DOI: 10.1073/pnas.91.12.5426.
18. Gabriel D, Vernier M, Pfeifer MJ et al. High throughput screening technologies for direct cyclic AMP measurement. *Assay Drug Dev Technol*. 2003;1(2):291–303. DOI: 10.1089/15406580360545107.
19. Li Y, Cummings RT, Cunningham BR. Homogeneous assays for adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase. *Anal Biochem*. 2003;321(2):151–156. DOI: 10.1016/s0003-2697(03)00397-x.
20. Prabhu L, Chen L, Wie H et al. Development of AlphaLISA high throughput technique to screen for small molecule inhibitors targeting protein arginine methyltransferases. *Mol Biosyst*. 2017;13(12):2509–2520. DOI: 10.1039/c7mb00391a.
21. Glickman JF, Wu X, Mercuri R et al. A comparison of ALPHAScreen, TR-FRET and TRF as assay methods for FXR nuclear receptors. *J Biomol Screen*. 2002;7(1):3–10. DOI: 10.1177/108705710200700102.
22. Eglen RM, Reisine T, Roby P et al. The use of AlphaScreen technology in HTS: current status. *Curr Chem Genomics*. 2008;1:2–10. DOI: 10.2174/1875397300801010002.
23. Prabhu L, Wei H, Chen L et al. Adapting AlphaLISA high throughput screen to discover a novel small molecule inhibitor targeting protein arginine methyltransferase 5 in pancreatic and colorectal cancers. *Oncotarget*. 2017;8(25):39963–39977. DOI:10.18632/oncotarget.18102.
24. Ott CA, Baljinnayam B, Zakharov AV et al. Cell lysate based AlphaLISA deubiquitinase assay platform for identification of small molecule inhibitors. *ACS Chem Biol*. 2017;12(9):2399–2407. DOI: 10.1021/acschembio.7b00543.
25. Muneoka S, Nakamura R, Hoshino M et al. Development of a novel immunoassay to select antibodies against intact membrane antigens by using the homogeneous AlphaLISA system. *J Biosci Bioeng*. 2018;126(4):522–526. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.04.018.
26. Yin H, Wang L, Liu HL. ENO1 Overexpression in Pancreatic Cancer Patients and Its Clinical and Diagnostic Significance. *Gastroenterol Res Pract*. 2018;2018:3842198. DOI: 10.1155/2018/3842198.
27. Yoshida Y, Hiwasa T, Machida T et al. Elevation of autoantibody in patients with ischemic stroke. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2018;58(7):303–310. DOI: 10.2176/nmc.ra.2018-0022.
28. Crans AJR, Wouters E, Valle-Leon M et al. Striatal Dopamine D2-muscarinic acetylcholine M1 receptor-receptor interaction in a model of movement disorders. *Front Pharmacol*. 2020;11:194. DOI: 10.3389/fphar.2020.00194.
29. Nakahata S, Syahrul C, Nakatake A. Clinical significance of soluble CADH1 as a novel marker for adult T-cell leukemia/Lymphoma. *Haematologica*. 2021;106(2):532–542. DOI: 10.3324/haematol.2019.234096.
30. Xiong Y, Wu Y, Luo S et al. Development of a novel immunoassay to detect interactions with the transactivation domain of p53: application to screening of new drugs. *Sci Rep*. 2017;7(1):9185. DOI: 10.1038/s41598-017-09574-7.
31. Hainaut P, Hollstein M. P53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*. 2000;77:81–137. DOI: 10.1016/s0065-230x(08)60785-x.
32. Voudsen KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413–431. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.037.
33. Bielefeld –Sevigny M. AlphaLISA immunoassay platform – the “no wash” high-throughput alternative to Elisa. *Assay Drug Dev Technol*. 2009;7(1):90–92. DOI: 10.1089/adt.2009.9996.
34. Беленичев ИФ. Фармакокинетический мониторинг лекарственных средств. Учебное пособие для магистров специальности: 224. Технологии медицинской диагностики и лечения и для студентов специальности 7.12020101 Фармация. Бухтиярова НВ, Павлов СВ, Рыжов АА, Рыженко ВП. Запорожье. 2018; 94 с. [Belenichev IF. Farmakokineticheskiy monitoring lekarstvennykh sredstv. Uchebnoye posobie dlya magistrów spetsial'nosti: 224. Tekhnologii meditsinskoi diagnostiki i lecheniya i dlya studentov spetsial'nosti 7.12020101 Farmatsiya. Bukhtiyarova NV, Pavlov SV, Ryzhov AA, Ryzenko VP Zaporozh'e; 2018. (In Russ).].
35. Morra L, Moser R. Alpha technology: a fast and sensitive orthogonal approach to cell-based potency assays. Perkin Elmer. Доступно по: https://www.ibr-inc.com/fileadmin/Downloads/REAGENTS_AlphaLISA_Bevacizumab_AppNote.pdf. Ссылка активна на 17.02.2021.
36. Yeung D, Ciotti S, Purushothama S et al. Evaluation of highly sensitive immunoassay technologies for quantitative measurements of sub pg/mL levels of cytokines in human serum. *J Immunol Methods*. 2016;437:53–63.
37. Modi KN, Parikh PK, Sen DJ. AlphaLISA biomarker as a tool of drug discovery and development. *Drug Dev & Res*. 2011;3(2):64–74. Доступно по: <https://www.ijddr.in/drug-development/alphalisa-biomarker-as-a-tool-of-drug-discovery-anddevelopment.pdf>. Ссылка активна на 17.02.2021.
38. Carlstrom J, Wilchek T, Kwei A. Development of pharmacokinetic (PK) assays for detecting biosimilars targeting TNFα using AlphaLISA. PerkinElmer. Доступно по: https://www.perkinelmer.com/labsolutions/resources/docs/APP_AlphaLISA_Pharmacokinetic_TNFα.pdf. Ссылка активна на 17.02.2021.
39. Human CD80 AlphaLISA detection kit. Perkin Elmer, product №AL3055C/F. Доступно по: <https://www.perkinelmer.com/product/alphalisa-cd80-human-kit-100pts-al3055hv>. Ссылка активна на 17.02.2021.
40. Wu Q, Lee HY, Wong PY et al. Development and applications of AlphaScreen – based FcRn binding assay to characterize monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 2015;420:31–37. DOI: 10.1016/j.jim.2015.03.012.
41. Leary BA, Lawrence-Henderson R, Mallozzi C et al. Bioanalytical platform comparison using a generic human IgG PK assay format. *J Immunol Methods*. 2013;397(1–2):28–36. DOI: 10.1016/j.jim.2013.08.009.
42. Human immunoglobulin G subclass 1(IgG1) (pharmacokinetic) kit, Perkin Elmer, product № AL303 C/F. Доступно по: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/TDS_AlphaLISA_AL303.pdf. Ссылка активна на 17.02.2021.
43. IFN-γ(human) AlphaLISA Detection kit. Доступно по: <https://www.perkinelmer.com/product/alphalisa-ifu-gamma-kit-500-assay-pts-al217c>. Ссылка активна на 17.02.2021.

Интерпретация данных фармакокинетики при доклиническом изучении новых лекарственных средств. Однократное внутривенное введение

Геодакян С. В.

Образовательное частное учреждение высшего образования «Московский инновационный университет»,
Москва, Россия

Аннотация. Обзорная статья. Дальнейшее развитие методологического уровня системы поддержки принятия решений, предложенной для организации первичного отбора и экспериментального доклинического изучения новых лекарственных средств (ЛС). Систематизированы способы описания и интерпретации данных основного фармакокинетического (ФК) эксперимента (однократное внутривенное введение ЛС). Предложена схема выбора моделей описания ФК поведения и свойств ЛС, основанная на визуальном распознавании образов.

Ключевые слова: система поддержки принятия решений; методология; фармакокинетика; модели; распознавание образов; анализ данных

Для цитирования:

Геодакян С. В. Интерпретация данных фармакокинетики при доклиническом изучении новых лекарственных средств. Однократное внутривенное введение. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1):55–60. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-55-60>

Поступила: 24 февраля 2022 г. **Принята:** 02 марта 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

Interpretation of pharmacokinetic data in preclinical studies of new drugs. Single intravenous administration

Geodakyan SV

Private educational institution of higher professional education "Moscow innovative university", Moscow, Russia

Abstract. Review. Further development of the methodological level of the decision support system proposed for the organization of primary selection and experimental preclinical study of new drugs. Methods for describing and interpreting the main pharmacokinetic experiment (single intravenous administration of drugs) data are systematized. A scheme for choosing pharmacokinetic models based on visual pattern recognition is proposed. Visual data patterns allow prediction of pharmacokinetic behavior and properties of new drugs.

Keywords: decision support system; methodology; pharmacokinetics; models; pattern recognition; data analysis

For citations:

Geodakyan SV. Interpretation of pharmacokinetic data in preclinical studies of new drugs. Single intravenous administration. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):55–60. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-55-60>

Received: February 24, 2021. **Accepted:** March 02, 2022. **Published:** March 30, 2022

Введение / Introduction

Область поиска и разработки новых лекарственных средств (ЛС) относится к мультидисциплинарным исследованиям. В процессе создания нового препарата осуществляется около 800 отдельных стадий исследований и разработок (R&D) [1]. Стоимость разработки новых ЛС остаётся крайне высокой (от 1 до 2,5 млрд долларов и около 10–15 лет). При этом менее 0,1 % новых соединений доходят до I фазы клинических исследований [2]. Из всех веществ, участвующих в доклинических разработках, лишь 2 % становятся зарегистрированными препаратами [3]. С целью стандартизации процесса доклинического изучения ЛС и повышения его эффективности была предложена единая система экспериментов (ЕСЭ), организованная по модульному принципу и использующая методологию скрининга. Предлагалась двухэтапная организация испытаний, при которой на первом этапе реализуется общая для всех веществ схема исследований, а на втором — индивидуализированная, выбранная по результатам первого этапа скрининга [4].

Предложенная система может осуществлять несколько функций: 1) включать в себя в виде правил уже накопленные знания; 2) создавать и пополнять

стандартизованный набор данных, которые можно использовать для извлечения новых знаний и правил и компьютерного предсказания свойств новых ЛС; 3) обучать специалистов в данной области и служить системой поддержки принятия решений. В самом общем виде можно выделить 4 уровня организации ЕСЭ: 1) методологический (знания, правила, блок схемы последовательности экспериментов и вопросы, на которые отвечает каждый блок); 2) методический (объекты исследований, схемы введения ЛС, методы проведения экспериментов, приборы и стандартные операционные процедуры (СОП)); 3) методы обработки, модели и критерии оценки результатов и 4) аппаратный уровень (компьютерные программы и база(ы) данных).

Методическому уровню уделялось много внимания, и он достаточно подробно изложен в ряде монографий [5, 6], статей [7], диссертаций [8–11] и рекомендаций по изучению ЛС в РФ [12, 13, 14] и других странах. Следует отметить важность применения СОП на всех этапах изучения ЛС. СОП позволяют проводить тренировку персонала, а также стандартизовать и последовательно улучшать процесс получения экспериментальных данных. О том, что в РФ такая практика работы не получила ещё широкого распространения,

может говорить отсутствие до середины 2021 г. статьи «СОП» в русскоязычной Википедии.

Попытки описания методологического уровня были предложены в ряде работ как продолжение детализации модулей ЕСЭ: общая для всех ЛС схема исследований качественных [15] и количественных [16] характеристик метаболизма, и специфичная для противоопухолевых препаратов схема изучения механизма их действия [17].

В настоящей работе предлагается схема описания и интерпретации данных основного фармакокинетического эксперимента (однократное внутривенное введение в максимальной, планируемой для применения, дозе). Цель данного эксперимента — ответить на следующие вопросы [4]: 1) сколько основного ЛС (и его метаболитов) присутствует в разных местах организма и в какое время? 2) как происходит распределение ЛС в организме (включая характеристики связывания с белками крови и тканями [18])? 3) как происходит выведение ЛС (включая характеристики биотрансформации [15, 16])? В дальнейшем, в случае внесосудистого применения, изучают всасывание ЛС.

Для целей стандартизации представления данных и сравнения различных препаратов необходимы достаточно простые и универсальные модели. Для этого можно рекомендовать немодельные подходы [19], концепцию клиренса [20], а также единую форму представления фармакокинетических данных [21]. Более подробное описание данных дают камерные и физиологические модели. Физиологические модели позволяют учитывать влияние различных интересующих факторов (пол, возраст, раса, сопутствующие заболевания, и т. д.).

Концепция клиренса / The concept of clearance

Общее описание процессов элиминации ЛС с использованием клиренсов не требует никаких модельных предположений и поэтому может быть использовано для их сравнения [22]. Клиренс — это гибридный параметр, отражающий как степень, так и скорость процесса элиминации [21]. Клиренс зависит от того, где измеряется концентрация ЛС — в крови (C_b) или плазме (C_p), а также несвязанного ЛС (C_u).

На уровне целого организма мы выделяем общий (CL), почечный (CL_r), непочечный (CL_{nr}) и метаболический (CL_m) клиренсы. Общий клиренс равен сумме клиренсов для всех путей (органов) выведения ЛС.

Клиренс может использоваться для описания как нелинейной [22], так и линейной кинетики ЛС, в последнем случае он не зависит от введенной дозы. Для линейной кинетики общее количество ЛС, выведенного в неизменённом состоянии ($AUC(t)$), почками ($AUC_u(t)$) или метаболизированного ($AUC_m(t)$) за время « t », прямо пропорционально площади под кривой концентрации ЛС в плазме крови до времени « t », и соответствующие значения клиренсов (CL , CL_r

и CL_m) являются коэффициентами пропорциональности [23].

Сравнение клиренса изучаемого вещества с клиренсом стандартного препарата, экскретирующегося за счёт клубочковой фильтрации (обычно используется инулин), позволяет судить не только о скорости, но и о механизмах его выведения с мочой. Если значение клиренса исследуемого препарата ниже, чем для стандартного, можно говорить об участии обратного всасывания в канальцах, если выше — то о канальцевой секреции [6].

Некомпаратментальный анализ / Non-instrumental analysis

Фармакокинетические параметры, определённые без использования специфической структуры камерной модели, также могут быть использованы для сравнения ЛС между собой. К таким параметрам относятся: площадь под кривой (AUC) концентрация ЛС — время ($C(t) - t$), константа скорости элиминации (λ_z), период полувыведения ($t_{1/2 z}$) и объём распределения в конечной фазе (V_z) [24].

Камерные модели / Chamber models

Процесс всасывания ЛС при внесосудистом введении влияет на его распределение и элиминацию, поэтому, чтобы исключить всасывание, первичный анализ кривой концентрации ЛС в плазме (C) от времени (t) обычно проводят при его внутривенном введении в высокой дозе. ЛС, введённое внутривенно, удаляется из плазмы по двум основным механизмам: (1) распределение в тканях организма и (2) метаболизм + экскреция.

Возникающее в результате снижение концентрации препарата в плазме в полулогарифмических координатах « $LgC(t) - t$ » имеет один или несколько линейных участков. Начальная фаза быстрого снижения концентрации в плазме (альфа фаза) в первую очередь связана с распространением ЛС из центрального отдела (кровообращение) в периферические отделы (ткани тела). Фазы постепенного снижения концентрации связаны с выведением препарата, то есть метаболизмом и выведением.

Ключевым элементом при анализе полученных графиков служит распознавание образов (pattern recognition) [25]. При этом можно различить четыре типа зависимостей: прямая, выпуклая, вогнутая и смешанная, состоящая из вогнутых и выпуклых участков (рис. 1 А, В, С, D). Когда альфа фаза отсутствует, можно применять одночастевые модели описания данных (рис. 1 А, В). Наличие альфа фазы (вогнутая форма кривой или наклон начальной части кривой больше конечного ($\lambda_1 > \lambda_n$)) говорит о необходимости введения двух или более камер для описания процесса распределения ЛС (рис. 1 С, D).

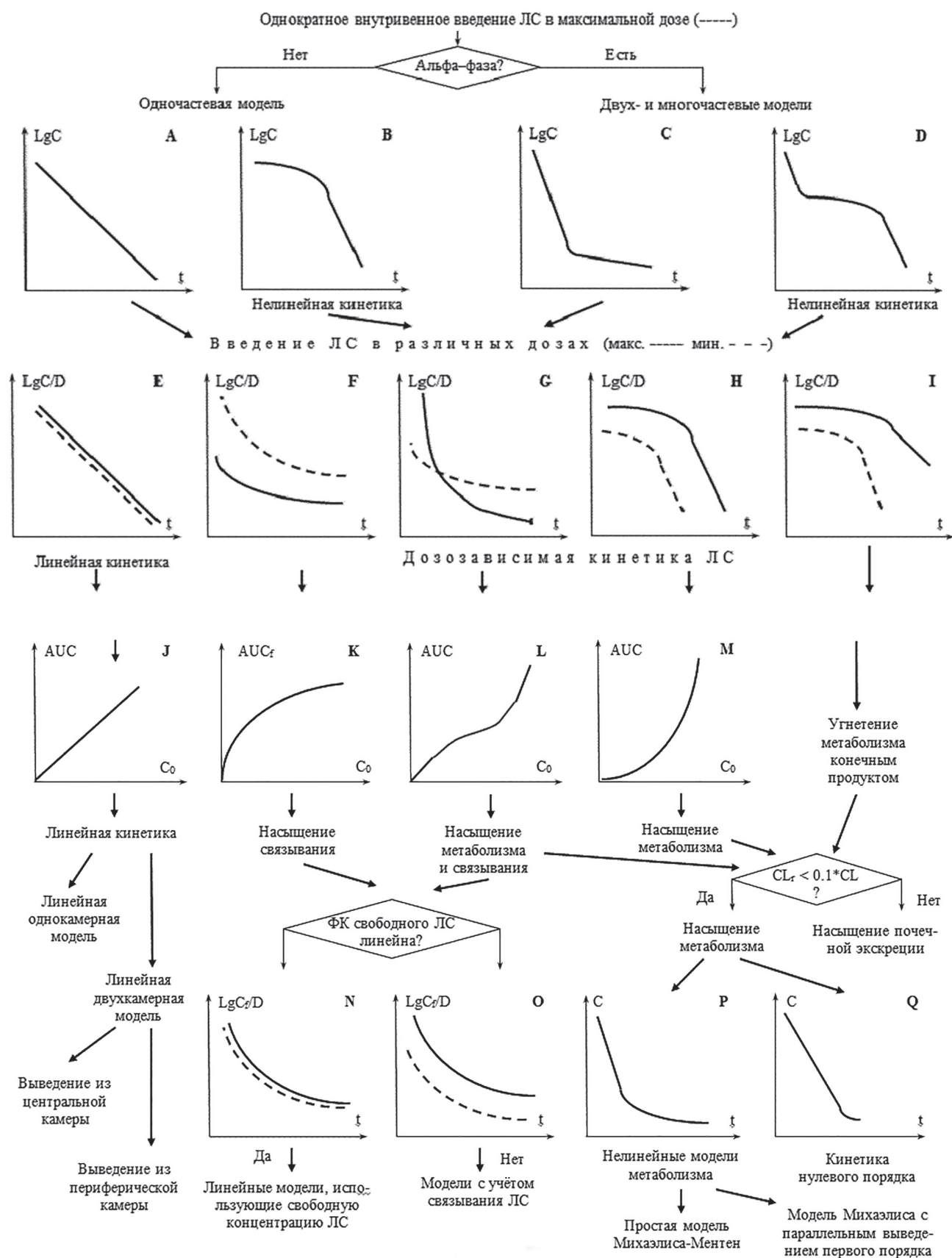


Рис. 1. Способы различения процессов, определяющих ФК ЛС и выбора моделей описания данных.
Figure 1. Distinguishing between the pharmacokinetic processes and the choice of data description models.

Выпуклая форма кривой (рис. 1 В), имеющая начальный наклон меньше конечного ($\lambda_1 < \lambda_n$), говорит о нелинейности и насыщении процессов элиминации ЛС. S-образная форма кривой (рис. 1 D) свидетельствует о насыщении процессов элиминации в конечной фазе (disposition). Первоначальное снижение наклона происходит за счёт процесса распределения (distribution), а последующее увеличение наклона со временем в конечной фазе — за счёт как процессов распределения, так и элиминации (disposition) [26].

Иногда могут наблюдаться необычные формы кривых, включая добавочные максимумы или плато. Возможными объяснениями могут быть явления кишечно-печёночной циркуляции (enterohepatic recycling), сильное связывание ЛС и его накопление в тканях [27, 28].

Проверку линейности фармакокинетики неизменённого ЛС проводят при его введении в различных дозах [29]. Когда концентрации ЛС делят на соответствующую величину дозы и наносят на график относительно времени, можно наблюдать пять основных ситуаций. Пропорциональное увеличение концентрации ЛС с увеличением дозы (нормализованные к дозе кривые « $LgC/D - t$ » совмещаются) (рис. 1 E) говорит о том, что процессы насыщения отсутствуют и фармакокинетика ЛС линейна [27].

Концентрации ЛС, возрастающие от дозы более чем пропорционально (нормализованная кривая для высокой дозы расположена выше) (рис. 1 H), говорит о насыщении процессов метаболизма [27]. Если нормализованная кривая для высокой дозы расположена ниже кривой для низкой дозы (рис. 1 F), это может говорить об обратном всасывании ЛС в почечных канальцах [30], или насыщении связывания ЛС [31, 32]. Другой возможной причиной такой формы кривой может быть наличие «глубокого» компартмента или компартмента с медленным установлением равновесия концентрации ЛС [27].

Пересечение нормализованных кривых (наклон нормализованной кривой для высокой дозы больше) (рис. 1 G) свидетельствует о том, что на кинетику ЛС влияет насыщение метаболизма и связывания. Такая картина — уменьшение периода полувыведения ЛС с увеличением дозы — была описана для 3-дезауридина [33].

Расхождение нормализованных кривых (наклон нормализованной кривой для высокой дозы меньше) (рис. 1 I), т. е. увеличение периода полувыведения ЛС с увеличением дозы, наблюдается, когда метаболит угнетает своё собственное образование (terminal product inhibition). В этом случае высокие дозы выводятся медленнее низких [34]. Такой тип дозовой зависимости отмечался после введения дикумарола, дифенилгидантоина и 6-диазо-5-оксо-L-норлейцина (ДОН) [35]. Нелинейное изменение концентраций с увеличением дозы может приводить к непропорциональному увеличению токсичности ЛС.

Узнать какие процессы элиминации ЛС подвергаются насыщению можно, определив вклад почечного

(CL_r) клиренса в общий (CL) клиренс. Если почечный клиренс составляет менее 10 % от общего, мы имеем насыщение метаболизма ЛС, если больше, — происходит насыщение процессов почечной экскреции [36]. Насыщение экскреции в почечных канальцах ответственно за дозозависимое фармакокинетическое поведение метотрексата, хлорталидона и пиперациллина [35].

Если система находится в насыщении, на графике « $C(t) - t$ » данные ложатся на прямую линию и описываются кинетикой нулевого порядка (рис. 1 Q). Если начальная часть графика — прямая линия в линейных координатах (рис. 1 P), применяется нелинейная модель (Михаэлиса-Ментен) [29, 36]. Если ЛС выводится почками в неизменённом виде, можно применять модель Михаэлиса-Ментен с параллельным выведением ЛС первого порядка.

Так как линейные модели проще и лучше разработаны, чем нелинейные, при обнаружении нелинейности полезно понять её природу. Нелинейность связана с процессами не первого порядка. Второй наиболее частой причиной нелинейности является связывание ЛС с белками плазмы крови и тканей [37]. Увеличенная скорость выведения свободного ЛС по мере увеличения дозы приводит к тому, что общая концентрация ЛС в плазме и площадь под кривой « $C(t) - t$ » не превышают постоянных (плато) значений. Это явление наблюдалось для ЛС, сильно связывающихся с белками плазмы крови, таких как дизопирамид, напроксен и фенилбутазон [33].

Вклад метаболизма и связывания в нелинейность ФК можно определить из графика « $AUC - C_0$ » для различных доз ЛС [37, 38]. Линейная зависимость говорит о линейной кинетике (рис. 1 J). При линейной фармакокинетике, возможно её описание при помощи статистических моментов [39].

Вогнутая форма кривой графика « $AUC - C_0$ » (рис. 1 M) говорит о нелинейности метаболизма [40], тогда как выпуклая форма — о связывании (рис. 1 K). Наличие вогнутых и выпуклых участков (рис. 1 L) говорит о насыщении обоих процессов. Когда присутствует насыщение связывания, имеет смысл измерить концентрации свободного ЛС, так как оно может иметь линейную кинетику (рис. 1 N).

Знание типа и структуры модели необходимо для определения констант скорости перехода между камерами и скорости элиминации. Как правило, число камер модели соответствует числу линейных участков на графике « $LgC(t) - t$ ». Конечный наклон графика отражает скорость самого медленного процесса фармакокинетики ЛС.

На последующих этапах изучают ФК ЛС при многократном и других способах введения. Интерпретация данных была изложена в ряде работ [25, 27].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Геодакян Сергей Вигенович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: sergeyg49@yandex.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8448-0923>

к. м. н., доцент ОЧУВО «Московский инновационный университет», Москва, Россия

Geodakyan Sergey V.

Corresponding author

e-mail: sergeyg49@yandex.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8448-0923>

Cand. Sci. Med., docent Moscow innovative university, Moscow, Russia

Список литературы / References

- Thesing J. Trendumkehr in der Arzneimittelforschung. *Naturwissenschaften*. 1977;64(12):601–605. DOI: 10.1007/bf00440091.
- Maurel J, Postigo A. Prognostic and Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer. From the Preclinical Setting to Clinical Practice. *Curr Cancer Drug Targets*. 2015;15(8):703–715. DOI: 10.2174/156800961508151001102822.
- Власов Д. Долгий путь от молекулы до лекарства: как пройти его максимально эффективно. Интерфакс. Образование 25 сентября 2018. [Vlasov D. Dolgii put' ot molekuly do lekarstva: kak proiti ego maksimal'no effektivno. Interfaks. Obrazovanie. 25 sentyabrya 2018. (In Russ).] Доступно по: <https://academia.interfax.ru/ru/analytics/research/1642/> Ссылка активна на 20.02.2022.
- Геодакян С.В., Нижний С.В., Ионов Б.В. Системно-методологические принципы организации первичного отбора и экспериментального изучения противоопухолевых препаратов. *Известия АН СССР Серия биологическая*. 1989;(2):212–218. [System-methodological principles for primary selection and experimental study of anti-cancer drugs. *Izvestiya AN SSSR Seriya biologicheskaya*. 1989;(2):212–218. (In Russ).]
- Горьков В.А. Тез. III Российского нац. конгр. “Человек и лекарство”. — М.: 1996: С. 17. [Gor'kov VA, Tez. III Rossiiskogo nats. kongr. “Chelovek i lekarstvo”. Moscow: 1996. (In Russ).]
- Берлянд А.С., Прокопов А.А. Методология изучения экспериментальной фармакокинетики и метаболизма новых лекарственных средств. — М.: МГМСУ; 2010, 182с. [Berlyand AS, Prokopov AA. Metodologiya izucheniya eksperimental'noi farmakokinetiki i metabolizma novykh lekarstvennykh sredstv. Moscow: MGMSU; 2010. (In Russ).]
- Берлянд А.С. Основные этапы исследования фармакокинетики субстанций новых препаратов. *Антибиотики и биотехнология*. 1987;32(7):489–492. [Berlyand AS. Osnovnye etapy issledovaniya farmakokinetiki substansii novykh preparatov. *Antibiotiki i biotekhnologiya*. 1987;32(7):489–492. (In Russ).]
- Гнеушев Е.Т. Оптимизация фармакокинетических исследований сердечно-сосудистых лекарственных средств: Дис. ... доктора мед. наук. Москва; 1991. [Gneushev ET. Optimizatsiya farmakokineticheskikh issledovaniy serdechno-sosudistykh lekarstvennykh sredstv. [dissertation] Moscow; 1991. (In Russ).] Доступно по: <https://search.rsl.ru/ru/record/01000070578>. Ссылка активна на 20.02.2022.
- Берлянд А.С. Комплексное химико-фармацевтическое и доклиническое фармакокинетическое исследование новых психотропных и антихолинэстеразных лекарственных средств: Дис. ... доктора фарм. наук. Москва; 1991. [Berlyand AS. Kompleksnoe khimiko-farmatsevticheskoe i doklinicheskoe farmakokineticheskoe issledovanie novykh psikhotropnykh i antikholinesteraznykh lekarstvennykh sredstv. [dissertation] Moscow; 1991. (In Russ).]
- Чистяков В.В. Методологические принципы доклинического исследования фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Дис. ... док. фарм. наук. Москва; 2004. [Chistyakov VV. Metodologicheskie printsipy doklinicheskogo issledovaniya farmakokinetiki i metabolizma lekarstvennykh sredstv. [dissertation] Moscow; 2004. (In Russ).] Доступно по: <http://www.dslib.net/farmakognozia/metodologicheskie-principy-doklinicheskogo-issledovaniya-farmakokinetiki-i.html>. Ссылка активна на 20.02.2022.
- Прокопов А.А. Методологические аспекты изучения экспериментальной фармакокинетики и метаболизма новых психотропных, ноотропных и антиоксидантных лекарственных средств. Дис. ... док. хим. наук. Москва; 2006. [Prokopov AA. Metodologicheskie aspekty izucheniya eksperimental'noi farmakokinetiki i metabolizma novykh psikhotropnykh, nootropnykh i antioksidantnykh lekarstvennykh sredstv. [dissertation] Moscow; 2006. (In Russ).] Доступно по: <http://www.dslib.net/farmakognozia/metodologicheskie-aspekty-izucheniya-jeksperimentalnoj-farmakokinetiki-i-metabolizma.html>. Ссылка активна на 20.02.2022.
- Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2005. [Khabriev RU. Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. 2005. (In Russ).]
- Фирсов А.А., Жердев В.П., Портной Ю.А. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. (под ред. А.Н. Миронова и др.) — М.: Гриф и К; 944 с. Глава 57. 2012:843–853. [Firsov AA, Zherdev VP, Portnoy YuA et al. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya. (pod red. A.N. Mironova et al.). Moscow; Grif i K; 944 s. Glava 57. 2012:843–853. (In Russ).]
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Ред. Фисенко В.П., Арзамасцев Е.В., Бабаян Э.А. — М.: Ремедиум; 2000. — 398 с. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv / Red. Fisenko VP, Arzamastsev EV, Babayan EA. Moscow: Remedium; 2000. (In Russ).]
- Geodakyan SV. Methodological Approach in the Study of Anticancer Drug Metabolism: Qualitative Considerations. *Drug Metab Rev*. 1993;25(1-2):153–172. DOI: 10.3109/03602539308993974.
- Геодакян С.В. Количественные характеристики метаболизма противоопухолевых соединений. *Известия АН СССР Серия биологическая*. 1990;(1):15–21. [Geodakyan SV. Quantitative parameters of antitumor drug metabolism. *Izvestiya AN SSSR Seriya biologicheskaya*. 1990;(1):15–21. (In Russ).]
- Геодакян С.В., Чернов В.А. Методологические проблемы первичного изучения механизма действия противоопухолевых препаратов. *Химико-фармацевтический журнал*. 1980;(11):21. [Geodakyan SV, Chernov VA. Metodologicheskie problemy pervichnogo izucheniya mekhanizma deistviya protivopukholevykh preparatov. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 1980;(11):21. (In Russ).]
- Tillement JP, Albengres E, Urien S. Methodological aspects of the evaluation of the binding of drugs to plasma and tissue proteins. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1979;4(3):123–127. DOI: 10.1007/bf03189413.
- Nüesch EA. Noncompartmental Approach in Pharmacokinetics Using Moments. *Drug Metab Rev*. 1984;15(1-2):103–131. DOI: 10.3109/03602538409015059.
- Wilkinson GR, Shand DG. A physiological approach to hepatic drug clearance. *Clin Pharmacol Ther*. 1975;18(4):377–390. DOI: 10.1002/cpt.1975184377.
- Sheiner LB, Benet LZ, Pagliaro LA. A standard approach to compiling clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1981;9(1):59–127. DOI: 10.1007/bf01059343.
- Larrey D, Branch RA. Clearance by the Liver: Current Concepts in Understanding the Hepatic Disposition of Drugs. *Semin Liver Dis*. 1983;3(4):285–297. DOI: 10.1055/s-2008-1040781.
- Garrett ER. in Pharmacokinetics: Mod. View, Proc. Sidney Riegelman Mem. Symp., San Francisco, CA, April 22-24, 1982, New York, London, 1984:253.
- SOP 13: Pharmacokinetic data analysis. *Onkologie*. 2003 Oct; 26 Suppl 6:56–59. DOI: 10.1159/000075016.
- Gabrielsson J, Meibohm B, Weiner D. Pattern Recognition in Pharmacokinetic Data Analysis. *AAPS J*. 2016;18(1):47–63. DOI: 10.1208/s12248-015-9817-6.
- Garrett ER, Bres J, Schnelle K, et al. Pharmacokinetics of saturably metabolized amobarbital. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1974;2(1):43–103. DOI: 10.1007/bf01062145.
- Garrett ER. The significance of properly designed preclinical studies in the clinical evaluation of new drugs. *Int J Clin Pharmacol Therapy and Toxicology*. 1970;4:6-20.
- Синицын А.Н., Холодов Л.Е. Колебания уровней лекарственных веществ в крови животных и человека после однократного введения. *Фармакология и Токсикология*. 1985;(1):93-99. [Sinityn AN, Kholodov LE. Kolebaniya urovnej lekarstvennykh veshchestv v krovi zhivotnykh i cheloveka

posle odnokratnogo vvedeniya. *Farmakologiya i Toksikologiya*. 1985;(1): 93–99. (In Russ.).

29. Wagner JG. Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics, Hamilton: Drug Intelligence Publications. 1979. ISBN: 0914678204.

30. Jusko WJ, Levy G. Pharmacokinetic Evidence for Saturable Renal Tubular Reabsorption of Riboflavin. *J Pharm Sci*. 1970;59(6):765–772. DOI: 10.1002/jps.2600590608.

31. Levy G. in Proc. Fourth Int. Congr. On Pharmacol., Basel: Schwabe. 1970;4:134–143.

32. Keen P. Handbook of Pharmacology, Vol XXVIII, Brodie BB, Gillette JR, editors. Part 1, Chapter 10, 1975.

33. Powis G, Ames MM, Kovach JC. Dose-dependent pharmacokinetics and cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1981;6(1):1–9. DOI: 10.1007/bf00253003.

34. Perrier D, Ashley JJ, Levy G. Effect of product inhibition on kinetics of drug elimination. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1973;1(3):231–242. DOI: 10.1007/bf01062349.

35. Vree TB, Hekster YA, Oosterbaan MJM, et al. Some Pitfalls in Selecting Descriptive Pharmacokinetic Models. *Drug Intell Clin Pharm*. 1984;18(9):708–713. DOI: 10.1177/106002808401800906.

36. Godfrey KR, Fitch WR. On the identification of Michaelis-Menten elimination parameters from a single dose-response curve. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1984;12(2):193–221. DOI: 10.1007/bf01059278.

37. Chau NP. Area-dose relationships in nonlinear models. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1976;4(6):537–551. DOI: 10.1007/bf01064557.

38. Smith BP, Vandenhende FR, DeSante KA et al. Confidence Interval Criteria for Assessment of Dose Proportionality. *Pharm Res*. 2000;17(10):1278–1283. DOI: 10.1023/A:1026451721686.

39. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Statistical moments in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1978;6(6):547–558. DOI: 10.1007/bf01062109.

40. Wagner JG. Properties of the Michaelis-Menten equation and its integrated form which are useful in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1973;1(2):103–120. DOI: 10.1007/bf01059625.

Исследование биоэквивалентности комбинированного препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи по сравнению с совместно принимаемыми двухкомпонентным препаратом Лозап® АМ и монокомпонентным препаратом Крестор® с участием здоровых добровольцев

Хохлов А. Л.¹, Гребенкин Д. Ю.², Фаева Е. К.², Казей В. И.², Хохлов А. А.³,
Мирошников А. Е.³, Лебедева О. В.⁴

¹ – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», Ярославль, Россия

² – ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Россия

³ – ООО «КлинФармИнвест», Ярославль, Россия

⁴ – Представительство АО «Санофи-авентис груп» (Франция), Москва, Россия

Аннотация. Актуальность. Основными преимуществами соединения лозартана, амлодипина и розувастатина в форме фиксированной комбинации по сравнению с монопрепаратами и двухкомпонентными комбинациями являются повышение терапевтической эффективности, снижение стоимости и облегчение приёма препарата пациентом, что, в целом, способствует улучшению приверженности пациента терапии. Проведены исследования биоэквивалентности комбинированного трёхкомпонентного препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи относительно совместно принимаемых препаратов Лозап® АМ (лозартан + амлодипин) и Крестор® (розувастатин). Цель. Целью данного исследования являлось сравнительное изучение фармакокинетики и подтверждение биоэквивалентности двух дозировок комбинированного препарата: 1) Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) относительно совместно принимаемых препаратов Лозап® АМ (лозартан + амлодипин, таблетки, 50 мг + 5 мг) и Крестор® (розувастатин, таблетки, 10 мг) у здоровых добровольцев после однократного приёма натощак; 2) Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) относительно совместно принимаемых препаратов Лозап® АМ (лозартан + амлодипин, таблетки, 100 мг + 5 мг) и Крестор® (розувастатин, таблетки, 20 мг), у здоровых добровольцев в возрасте 18–45 лет после однократного приёма натощак. Методы. Для подтверждения биоэквивалентности было проведено открытое, сравнительное, рандомизированное, перекрёстное клиническое исследование с четырьмя периодами для каждой из исследуемых дозировок комбинированного препарата. В полученных от добровольцев образцах плазмы крови при помощи валидированной ВЭЖХ-МС/МС методики определялись концентрации лозартана, амлодипина и розувастатина. Результаты. На основании результатов статистического и фармакокинетического анализа было показано, что фармакокинетические параметры сравниваемых препаратов характеризуются высоким сходством в отношении лозартана, амлодипина и розувастатина. 90 % ДИ находились в пределах диапазона биоэквивалентности для C_{max} (амлодипина), AUC_{0-72} (для амлодипина) и AUC_{0-t} (для лозартана и розувастатина). 90 % ДИ для C_{max} лозартана и розувастатина находились в пределах расчётных расширенных границ биоэквивалентности в соответствии с протоколом исследования. Заключение. Таким образом, согласно применяемым критериям, препараты Лозартан+амлодипин+розувастатин Санофи и совместно принимаемые двухкомпонентный препарат Лозап® АМ и монокомпонентный препарат Крестор® признаны биоэквивалентными.

Ключевые слова: комбинированные препараты; фармакокинетика; биоэквивалентность

Для цитирования:

Хохлов А. Л., Гребенкин Д. Ю., Фаева Е. К., Казей В. И., Хохлов А. А., Мирошников А. Е., Лебедева О. В. Исследование биоэквивалентности комбинированного препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи по сравнению с совместно принимаемыми двухкомпонентным препаратом Лозап® АМ и монокомпонентным препаратом Крестор® с участием здоровых добровольцев. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1):61–74. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-61-74>

Поступила: 10 марта 2022 г. **Принята:** 18 марта 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

Bioequivalence study of fixed-dose combination Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi in comparison with coadministered fixed-dose combination Lozap® AM and monocomponent drug Crestor® in healthy subjects

Khokhlov AL¹, Grebenkin DY², Faeva EK², Kazey VI², Khokhlov AA³, Miroshnikov AE³, Lebedeva OV⁴

¹ – Yaroslavl State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Yaroslavl, Russia

² – LLC ExacteLabs, Moscow, Russia

³ – LLC ClinPharmInvest, Yaroslavl, Russia

⁴ – Representative office of Sanofi (France), Moscow, Russia

Abstract. Introduction. The advantages of fixed-dose combination losartan + amlodipine + rosuvastatin compared to mono-drugs and two-component combinations are to increase the therapeutic efficacy, to reduce the cost of the product and to make the drug easier to take which helps to improve patient adherence to therapy. A bioequivalence study of the three-component fixed-dose combinations Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi with coadministered Lozap® AM (Losartan+Amlodipine) and Crestor® (Rosuvastatin) was conducted. **Aim.** The purpose of the bioequivalence trial was a comparative study of the pharmacokinetics and evidence of the bioequivalence of two strengths of fixed-dose combination: 1) Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi (tablets, 50 mg + 5 mg + 10 mg) in comparison with coadministered drugs Lozap® AM (losartan + amlodipine, tablets, 50 mg + 5 mg,) and Crestor® (rosuvastatin, tablets, 10 mg) in fasting healthy volunteers after a single administration; 2) Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi (tablets, 100 mg + 5 mg + 20 mg) in comparison with coadministered drugs Lozap® AM (losartan + amlodipine, tablets, 100 mg + 5 mg) and Crestor® (rosuvastatin, tablets, 20 mg) in fasting

healthy volunteers 18–45 years old after a single dose. *Materials and methods.* To prove bioequivalence, an open label, comparative, randomized, crossover four-period clinical trial was conducted for each strengths of fixed-dose combination. The concentrations of losartan, amlodipine and rosuvastatin in blood plasma samples obtained from volunteers were determined by a validated HPLC-MS/MS method. A pharmacokinetic and statistical analysis was performed and confidence intervals (CI) for the pharmacokinetic parameters C_{max} , AUC_{0-72} (for amlodipine) and AUC_{0-t} (for losartan and rosuvastatin) were calculated. *Results and discussion.* Based on the results of statistical and pharmacokinetic analysis, it was shown that the studied formulations are bioequivalent in terms of pharmacokinetic parameters of losartan, amlodipine and rosuvastatin. 90 % CI were in the acceptable range for C_{max} (of amlodipine), AUC_{0-72} (of amlodipine) and AUC_{0-t} (of losartan and rosuvastatin). 90 % CI for C_{max} of losartan and rosuvastatin were in the acceptable extended calculated range according to the protocol. *Conclusion.* Thus, according to the criteria used in the studies, the three-component fixed-dose combinations Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi are proved to be bioequivalent in comparison with coadministered Lozap® AM and Crestor®.

Keywords: fixed-dose combination; pharmacokinetics; bioequivalence

For citations:

Khokhlov AL, Grebenkin DYU, Faeva EK, Kazey VI, Khokhlov AA, Miroshnikov AE, Lebedeva OV. Bioequivalence study of fixed-dose combination Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi in comparison with coadministered fixed-dose combination Lozap® AM and monocomponent drug Crestor® in healthy subjects. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):XX–XX. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-XX-XX>

Received: March 10, 2021. **Accepted:** March 18, 2022. **Published:** March 30, 2022.

Введение / Introduction

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются самой распространённой причиной смерти в мире [1]. Главными причинами возникновения [2–4] и развития [5] ССЗ являются гипертония и высокий уровень липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). Лекарственные вещества, которым посвящена данная работа, являются одними из самых хорошо изученных и востребованных лекарственных препаратов в мировой кардиологии.

Лозартан — это антагонист рецепторов ангиотензина II (тип AT1), который, как было показано в клинических исследованиях, снижает артериальное давление так же эффективно, как и другие гипотензивные препараты первого ряда [6].

Статины (ингибиторы ГМГ-КоА редуктазы), в свою очередь, являются препаратами первого ряда для контроля уровня холестерина в крови, которые значительно снижают смертность от ССЗ [7, 8]. По сравнению с другими статинами, розувастатин более эффективно (включая аторвастатин и симвастатин) снижает уровень ЛПНП, обладая при этом сопоставимой переносимостью [9].

Блокатор медленных кальциевых каналов амлодипин, как было показано в исследованиях, является эффективным и хорошо переносимым препаратом для лечения повышенного артериального давления и рекомендуется ведущими международными клиническими руководствами как для монотерапии, так и в комбинации с другими препаратами [10].

Было установлено, что тройная комбинация лозартана калия, амлодипина и розувастатина снижает артериальное давление и уровень ЛПНП эффективнее, чем двойные комбинации лозартан + розувастатин и лозартан + амлодипин [11]. Кроме того, следует заметить, что важным преимуществом фиксированных комбинаций перед совместно применяемыми монопрепаратами является простота приёма (одна таблетка вместо двух), а также сравнительно более низкая стоимость [12, 13].

Целью описанной работы было сравнительное исследование фармакокинетики и подтверждение биоэквивалентности фиксированных комбинаций лозартан + амлодипин + розувастатин по сравнению с совместно принимаемыми фиксированной комбинацией лозартан + амлодипин и монопрепаратом розувастатина у здоровых добровольцев. Изучение биоэквивалентности комбинированного препарата относительно нескольких, совместно принимаемых одной дозой препаратов — это распространённый подход в мировой практике [14, 15].

Материалы и методы / Materials and methods

Этические принципы / Ethical principles

Оба описанных исследования проводились в соответствии с протоколами, принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, стандартами по Надлежащей Клинической Практике (ICH GCP), а также в соответствии с другими законодательствами. Участие добровольцев в исследовании являлось добровольным. Доброволец имел право отказаться от участия в проводимом исследовании на любой его стадии. Этическую экспертизу клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов проводил Совет по этике при Министерстве здравоохранения и Локальный этический комитет (ЛЭК).

Разрешение на проведение клинического исследования Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (50 мг + 5 мг + 10 мг) было выдано Министерством здравоохранения РФ — № 553 от 20 октября 2017 года. Решение об этическом одобрении проведения клинического исследования №147 было принято на заседании Совета по этике при Министерстве здравоохранения от 16 мая 2017 года. Одобрение протокола версии 2.0 № 168 от 24 апреля 2018 года. Кроме того, до начала исследования было получено разрешение на проведение исследования от Локального Этического комитета Исследовательского центра — Этического комитета НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Ярославль ОАО «РЖД» (протокол заседания № 52 от 24 октября 2018 г.).

Разрешение на проведение клинического исследования Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (100 мг + 5 мг + 20 мг) было выдано Министерством здравоохранения РФ — № 629 от 06 декабря 2017 года. Решение об этическом одобрении проведения клинического исследования № 147 было принято на заседании Совета по этике при Министерстве здравоохранения от 16 мая 2017 года. Одобрение протокола версии 2.0 № 168 от 24 апреля 2018 года. Кроме того, до начала исследования было получено разрешение на проведение исследования от Локального Этического комитета Исследовательского центра — Этического комитета Государственного автономного учреждения здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница № 2» (протоколы заседания № 25 от 16 октября 2018 г. и № 27 от 23 ноября 2018 г.).

Все одобренные документы были получены до выполнения добровольцами каких-либо процедур исследования, включая тесты скрининга для оценки пригодности.

Дизайн исследований / Research design

Дизайн обоих исследований был одинаков. Оба исследования биоэквивалентности являлись открытыми, рандомизированными, перекрёстными, четырёх-этапными клиническими исследованиями по оценке биоэквивалентности с повторным дизайном. Биоэквивалентность изучали для комбинированных препаратов Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки в двух вариантах дозирования) и принимаемых в соответствующих эквивалентных дозировках комбинированного препарата Лозап® АМ (лозартан + амлодипин, таблетки) в сочетании с монокомпонентным препаратом Крестор® (розувастатин, таблетки) у здоровых добровольцев 18–45 лет после однократного приёма натощак.

График обоих исследований включал 4 периода приёма препарата и три периода «отмывания» не менее 14 суток.

Все добровольцы были разделены на 2 группы — А и Б. Каждый доброволец был отнесён к одной из последовательностей приёма препаратов: TRTR (А) или RTRT (Б). Добровольцы, включённые в группу А, в первом и третьем периодах исследования получали исследуемый препарат (Т), а представители группы Б — препараты сравнения (R). Таким образом, общая схема исследования была «TRTR | RTRT».

В ходе клинического исследования Лозартан + амлодипин + розувастатин (50 мг + 5 мг + 10 мг) было скринировано 89 человек обоих полов, 68 добровольцев было рандомизировано. Восемь из рандомизированных добровольцев выбыли в ходе исследования. Таким образом, популяция для оценки безопасности составила 68 человек, популяция для оценки фармакокинетики состояла из 60 человек. Средний возраст добровольцев составил 27,2±6,9 лет, рост 170,7±8,29 см, масса тела 69,2±12,62 кг, средний индекс массы тела 23,9±4,17 кг/м².

В ходе клинического исследования Лозартан + амлодипин + розувастатин (100 мг + 5 мг + 20 мг) было скринировано 95 человек обоих полов, 68 добровольцев было рандомизировано. Пять из рандомизированных добровольцев выбыли в ходе исследования. Таким образом, популяция для оценки безопасности составила 68 человек, популяция для оценки фармакокинетики по первым двум периодам состояла из 64 человек, по всем четырем периодам — из 63 человек. Средний возраст добровольцев составил 26,6±6,9 лет, рост 170,27±8,54 см, масса тела 67,38±11,55 кг, средний индекс массы тела 23,03±3,28 кг/м².

Добровольцы каждой подгруппы находились в том же клиническом центре, следовали одинаковым процедурам и требованиям протокола. Все манипуляции с образцами проводились в одинаковых условиях (включая, но не ограничиваясь использованием одинакового типа и производства внутривенных катетеров, игл, одинаковых систем дезинфекции, типов лабораторных и транспортных пробирок, морозильных камер и т. д.).

Исследуемые препараты / Investigational drugs

Действующими веществами исследуемого препарата и препаратов сравнения являлись лозартан, амлодипин и розувастатин.

В исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) использовались:

Референтные (сравнения, R):

— Лозап® АМ (лозартан + амлодипин, таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 50 мг + 5 мг, Ханми Фарм Ко., Лтд., Республика Корея, серия 811317021);

— Крестор® (розувастатин [в форме розувастатина кальция] таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 10 мг, АстраЗенека ЮК Лимитид, Великобритания, серия NC166).

Данные препараты принимались добровольцами одновременно.

Исследуемый (тест, Т):

Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи, (таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 50 мг + 5 мг + 10 мг, компании АО Санофи Россия, серия 22725).

В исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) использовались:

Референтные (сравнения, R):

— Лозап® АМ (лозартан + амлодипин, таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 100 мг + 5 мг, Ханми Фарм Ко., Лтд., Республика Корея, серия 811417021);

— Крестор® (розувастатин [в форме розувастатина кальция] таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 20 мг, АстраЗенека ЮК Лимитид, Великобритания, серия MX493).

Данные препараты принимались добровольцами одновременно.

Исследуемый (тест, Т):

Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи,

(таблетки, покрытые плёночной оболочкой, 100 мг + 5 мг + 20 мг, компании АО Санофи Россия, серия 20126).

Введение препарата и отбор образцов / Drug administration and sampling

Исследуемый препарат применялся внутрь одной таблеткой в соответствующей дозе (50 мг + 5 мг + 10 мг или 100 мг + 5 мг + 20 мг), препараты сравнения принимались в аналогичной дозировке двумя отдельными таблетками за один раз. Доброволец запивал таблетки 200 мл воды.

Было отобрано 23 образца крови от каждого участника исследования в каждом периоде: до приёма препарата (0) и через 0:15; 0:30; 0:45; 1:00; 1:15; 1:30; 2:00; 3:00; 4:00; 4:30; 5:00; 5:30; 6:00; 7:00; 8:00; 9:00; 10:00; 12:00; 16:00; 24:00; 48:00; 72:00 часов после приёма лекарственного средства. Отбор образцов крови осуществлялся в вакуумные пробирки (вакутейнеры) объёмом 6 мл, содержащие K_2 ЭДТА в качестве антикоагулянта. Сразу после этого пробирки перемешивались, центрифугировались при охлаждении. Плазму из супернатанта переносили в две предварительно промаркированные криопробирки (аналитическая (А) и архивная аликвоты (В)). После переноса плазмы в криопробирки её незамедлительно замораживали на сухом льду. До отправки все образцы хранились в клиническом центре в морозильной камере с контролируемой температурой $\leq -70^\circ\text{C}$.

Анализ концентраций лозартана и розувастатина в плазме был выполнен во всех отобранных временных точках. Анализ концентрации амлодипина в плазме был выполнен в 16 образцах, взятых во временные точки: до приёма препарата (0) и через 1:00; 2:00; 3:00; 4:00; 5:00; 6:00; 7:00; 8:00; 9:00; 10:00; 12:00; 16:00; 24:00; 48:00; 72:00 часов.

Поскольку данное исследование являлось открытым для добровольца и врача-исследователя, то не планировалось применять ослепление. Однако сотрудники лаборатории, принимавшие участие в биоаналитической стадии исследования, не были информированы о схеме рандомизации и последовательности приёма исследуемого и референтного препаратов.

Анализ концентрации действующих веществ в образцах / Analysis of the concentration of active substances in samples

Для определения концентраций лозартана, амлодипина и розувастатина в образцах, полученных в клинической части исследования, была использована ВЭЖХ-МС/МС методика, валидированная в соответствии с руководствами [14, 15]. В качестве внутреннего стандарта использовались дейтерированные лозартан, амлодипин и розувастатин. Аналитическая серия включала: 1 холостой образец, 1 холостой образец с добавлением внутреннего стандарта, 9 калибровочных образцов, 6 образцов контроля качества, образцы от

одного добровольца из четырёх периодов. Аналитическая методика предполагала использование 200 мкл образца для каждого анализа. Аналитический диапазон методики для лозартана находился в пределах 2–500 нг/мл, для розувастатина — 0,1–50 нг/мл и для амлодипина — 0,1–10 нг/мл в плазме. Для расчёта концентраций использовалась взвешенная линейная регрессия. Подготовка проб осуществлялась методом депротеинизации (осаждения белков) с дополнительной очисткой путём выдерживания в морозильной камере при -20°C в течение 90 мин. Полученные пробы были проанализированы на ВЭЖХ системе Waters Acquity I-class (Waters, США) с tandemным масс-спектрическим детектором Sciex 4500 TripleQuad (Sciex, США). Хроматографическое разделение аналитов осуществляли в градиентном режиме с использованием хроматографической колонки Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μm , 2,1×100 mm (Waters, США).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Участники исследования и безопасность / Research participants and safety

По результатам исследования спектр нежелательных явлений у исследуемых препаратов по количественным и качественным признакам был схож. Не наблюдалось клинически значимого влияния препаратов Лозартан + амлодипин + розувастатин на данные физикального обследования (кроме влияния на артериальное давление и частоту сердечных сокращений, которое обусловлено фармакологическим действием препарата), на лабораторные параметры безопасности и результаты электрокардиограммы.

Фармакокинетические параметры и оценка биоэквивалентности / Pharmacokinetic parameters and bioequivalence assessment

Фармакокинетические параметры лозартана / Pharmacokinetic parameters of losartan

Фармакокинетические параметры лозартана в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) представлены в табл. 1, а усреднённые фармакокинетические кривые представлены на рис. 1.

Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $AUC_{0-t}(T) / AUC_{0-t}(R)$, характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референтному, составило 100,10 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $C_{max}(T) / C_{max}(R)$, характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 92,44 %.

Фармакокинетические параметры лозартана в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) представлены в табл. 2, а усреднённые фармакокинетические кривые представлены на рис. 2.

Таблица 1

Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров лозартана в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) Санофи (N – число измерений, CV – коэффициент вариации)

Table 1

Summary average pharmacokinetic parameters of losartan in the Losartan + amlodipine + rosuvastatin (tablets, 50 mg + 5 mg + 10 mg) Sanofi study (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T) N = 125		Референтный препарат (R) Reference formulation (R) N = 125		Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)
	Среднее Average	CV, (%)	Среднее Average	CV, (%)	
C_{max} , нг/мл C_{max} , ng/ml	267,09	56,32	288,92	54,76	92,44
t_{max} , ч t_{max} , h	0,93	71,59	0,83	51,87	111,40
AUC_{0-t} , нг · ч/мл AUC_{0-t} , ng · h/ml	466,68	38,81	466,19	39,70	100,10
λ_z , ч ⁻¹ λ_z , h ⁻¹	0,33	25,92	0,33	25,84	101,01
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	2,26	34,96	2,27	32,50	99,71

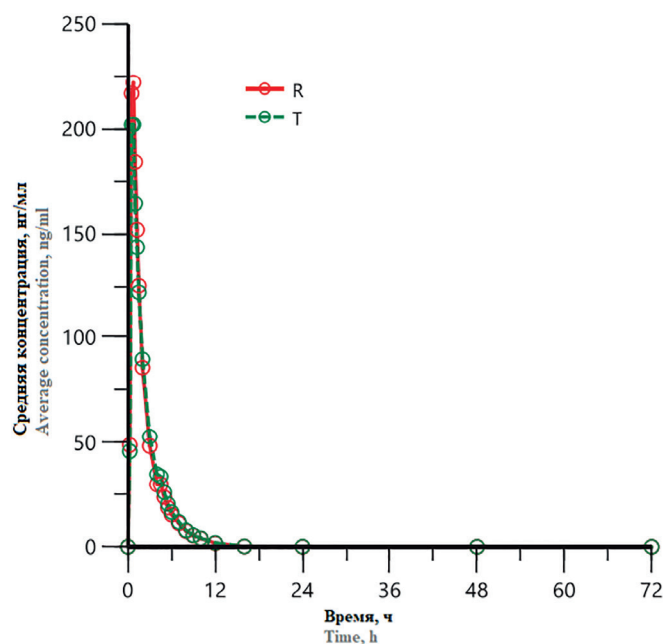


Рис. 1. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили лозартана в плазме крови добровольцев после однократного приёма комбинированного **исследуемого** препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) в сравнении с приёмом комбинированного **референтного** препарата Лозап® АМ (таблетки, лозартан + амлодипин, 50 мг + 5 мг), T – исследуемый (тестируемый) препарат, R – препарат сравнения (референтный)

Fig. 1. Mean pharmacokinetic profiles of **losartan** in the blood plasma of volunteers after a single dose of the **test** drug fixed-dose combination Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi (tablets, 50 mg + 5 mg + 10 mg) and **comparison** fixed-dose combination Lozap® AM (losartan + amlodipine, tablets, 50 mg + 5 mg), T – test drug, R – comparison drug

Источник: Хохлов А.Л. и соавт., 2022

Source: Khokhlov AL et al., 2022

Таблица 2

Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров лозартана в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) Санофи (N – число измерений, CV – коэффициент вариации)

Table 2

Summary average pharmacokinetic parameters of losartan in the Losartan+amlodipine+rosuvastatin (tablets, 100 mg + 5 mg + 20 mg) Sanofi study (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T) N = 127		Референтный препарат (R) Reference formulation (R) N = 127		Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)
	Среднее Average	CV, (%)	Среднее Average	CV, (%)	
C_{max} , нг/мл C_{max} , ng/ml	590,43	52,18	626,14	45,57	94,30
t_{max} , ч t_{max} , h	1,08	63,75	0,97	42,54	111,87
AUC_{0-t} , нг · ч/мл AUC_{0-t} , ng · h/ml	916,20	37,85	923,08	35,00	99,25
λ_z , ч ⁻¹ λ_z , h ⁻¹	0,30	34,98	0,30	32,38	99,16
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	2,86	85,05	2,65	55,63	107,82

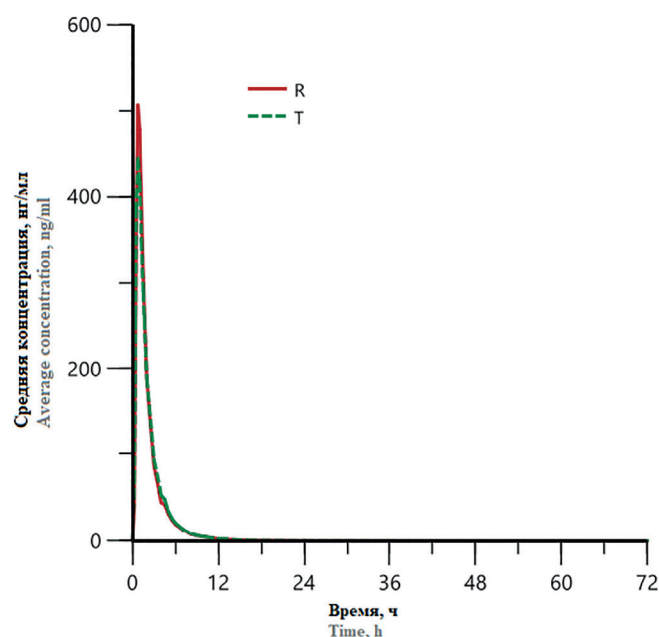


Рис. 2. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили лозартана в плазме крови добровольцев после однократного приёма комбинированного **исследуемого** препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) в сравнении с приёмом комбинированного **референтного** препарата Лозап® АМ (таблетки, лозартан + амлодипин, 100 мг + 5 мг), Т – исследуемый (тестируемый) препарат, R – препарат сравнения (референтный)

Fig. 2. Mean pharmacokinetic profiles of **losartan** in the blood plasma of volunteers after a single dose of the **test** drug fixed-dose combination Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi (tablets, 100 mg + 5 mg + 20 mg) and **comparison** fixed-dose combination Lozap® AM (losartan + amlodipine, tablets, 100 mg + 5 mg), T – test drug, R – comparison drug.

Источник: Хохлов А.Л. и соавт., 2022

Source: Khokhlov AL et al., 2022

Таблица 3

Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров амлодипина в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) Санофи (N – число измерений, CV – коэффициент вариации)

Table 3

Summary average pharmacokinetic parameters of amlodipine in the Losartan + amlodipine + rosuvastatin (tablets, 50 mg + 5 mg + 10 mg) Sanofi study (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T) N = 123		Референтный препарат (R) Reference formulation (R) N = 123		Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)
	Среднее Average	CV, (%)	Среднее Average	CV, (%)	
C_{max} , нг/мл C_{max} , ng/ml	3,14	23,48	3,15	22,30	99,78
t_{max} , ч t_{max} , h	6,64	27,85	6,72	24,49	98,70
AUC_{0-72} , нг · ч/мл AUC_{0-72} , ng · h/ml	109,26	24,90	107,21	23,04	101,92
λ_z , ч ⁻¹ λ_z , h ⁻¹	0,02	24,43	0,02	24,67	98,60
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	40,22	28,24	39,14	23,37	102,76

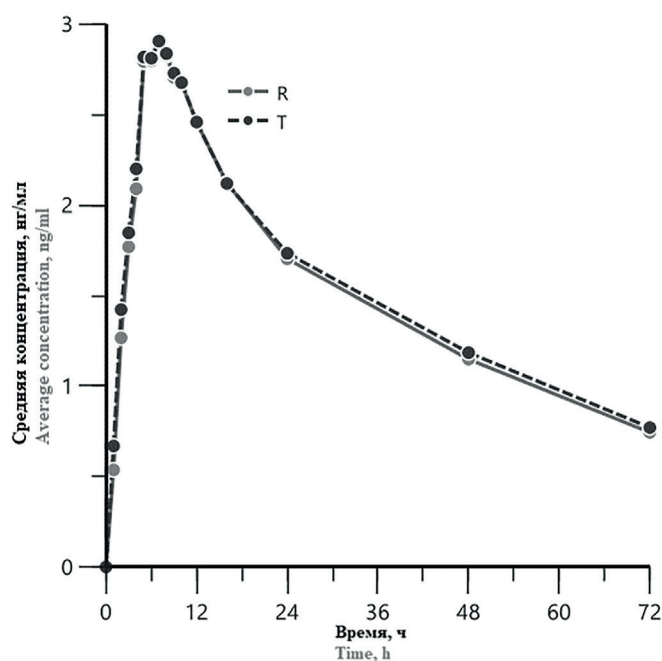


Рис. 3. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили **амлодипина** в плазме крови добровольцев после однократного приёма комбинированного **исследуемого** препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) в сравнении с приёмом комбинированного **референтного** препарата Лозап® AM (таблетки, лозартан + амлодипин, 50 мг + 5 мг), T – исследуемый (тестируемый) препарат, R – препарат сравнения (референтный)

Fig. 3. Mean pharmacokinetic profiles of **amlodipine** in the blood plasma of volunteers after a single dose of the **test** drug fixed-dose combination Losartan+amlodipine+rosuvastatin Sanofi (tablets, 50 mg + 5 mg + 10 mg) and **comparison** fixed-dose combination Lozap® AM (losartan+amlodipine, tablets, 50 mg + 5 mg), T – test drug, R – comparison drug

Источник: Хохлов А.Л. и соавт., 2022

Source: Khokhlov AL et al., 2022

Таблица 4

Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров амлодипина в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) Санофи (N – число измерений, CV – коэффициент вариации)

Table 4

Summary average pharmacokinetic parameters of amlodipine in the Losartan + amlodipine + rosuvastatin (tablets, 100 mg + 5 mg + 20 mg) Sanofi study (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T) N = 127		Референтный препарат (R) Reference formulation (R) N = 127		Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)
	Среднее Average	CV, (%)	Среднее Average	CV, (%)	
C_{max} , нг/мл C_{max} , ng/ml	2,95	30,08	2,87	27,54	102,57
t_{max} , ч t_{max} , h	6,83	21,87	7,18	21,52	95,17
AUC_{0-72} , нг · ч/мл AUC_{0-72} , ng · h/ml	101,62	27,65	99,86	28,00	101,76
λ_z , ч ⁻¹ λ_z , h ⁻¹	0,02	22,55	0,02	19,92	100,53
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	38,67	26,30	38,49	25,02	100,47

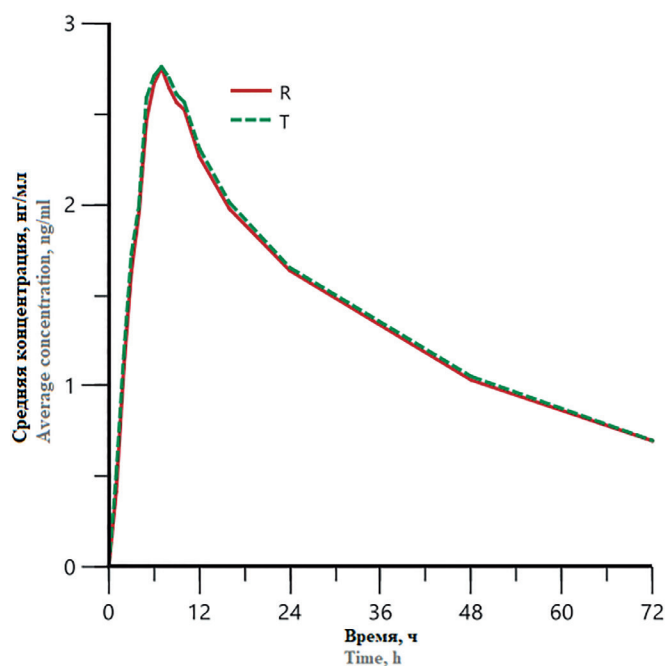


Рис. 4. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили **амлодипина** в плазме крови добровольцев после однократного приёма комбинированного **исследуемого** препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) в сравнении с приёмом комбинированного **референтного** препарата Лозап® АМ (таблетки, лозартан + амлодипин, 100 мг + 5 мг), Т – исследуемый (тестируемый) препарат, R – препарат сравнения (референтный)

Fig. 4. Mean pharmacokinetic profiles of **amlodipine** in the blood plasma of volunteers after a single dose of the **test** drug fixed-dose combination Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi (tablets, 100 mg + 5 mg + 20 mg) and **comparison** fixed-dose combination Lozap® AM (losartan+amlodipine, tablets, 100 mg + 5 mg), T – test drug, R – comparison drug

Источник: Хохлов А.Л. и соавт., 2022

Source: Khokhlov AL et al., 2022

Таблица 5

Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров розувастатина в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) Санофи (N – число измерений, CV – коэффициент вариации)

Table 5

Summary average pharmacokinetic parameters of rosuvastatin in the Losartan+amlodipine+rosuvastatin (tablets, 50 mg + 5 mg + 10 mg) Sanofi study (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T) N = 123		Референтный препарат (R) Reference formulation (R) N = 123		Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)
	Среднее Average	CV, (%)	Среднее Average	CV, (%)	
C_{max} , нг/мл C_{max} , ng/ml	10,25	58,27	10,51	73,23	97,58
t_{max} , ч t_{max} , h	2,42	56,03	2,34	57,22	103,45
AUC_{0-t} , нг · ч/мл AUC_{0-t} , ng · h/ml	65,47	56,89	64,62	51,54	101,31
λ_z , ч ⁻¹ λ_z , h ⁻¹	0,03	56,87	0,04	72,29	92,95
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	25,45	83,95	23,08	39,59	110,26

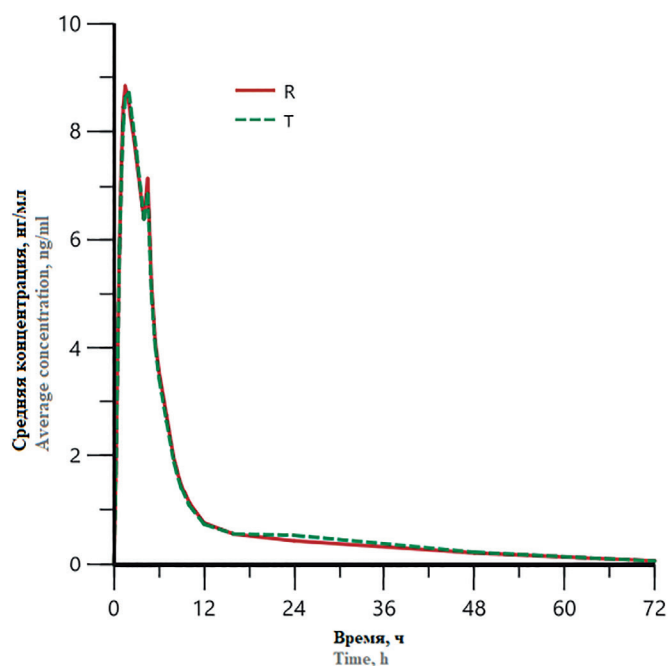


Рис. 5. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили **розувастатина** в плазме крови добровольцев после однократного приёма комбинированного **исследуемого** препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) в сравнении с приёмом монокомпонентного **референтного** препарата Крестор® (розувастатин, таблетки, 10 мг), T – исследуемый (тестируемый) препарат, R – препарат сравнения (референтный)

Fig. 5. Mean pharmacokinetic profiles of **rosuvastatin** in the blood plasma of volunteers after a single dose of the **test** drug fixed-dose combination Losartan + amlodipine + rosuvastatin Sanofi (tablets, 50 mg + 5 mg + 10 mg) and **comparison** monocomponent drug Crestor® (rosuvastatin, tablets, 10 mg), T – test drug, R – comparison drug

Источник: Хохлов А.Л. и соавт., 2022

Source: Khokhlov AL et al., 2022

Таблица 6

Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров розувастатина в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) Санофи (N – число измерений, CV – коэффициент вариации)

Table 6

Summary average pharmacokinetic parameters of rosuvastatin in the Losartan + amlodipine + rosuvastatin (tablets, 100 mg + 5 mg + 20 mg) Sanofi study (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T) N = 127		Референтный препарат (R) Reference formulation (R) N = 127		Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)
	Среднее Average	CV, (%)	Среднее Average	CV, (%)	
C_{max} , нг/мл C_{max} , ng/ml	22,44	52,01	26,61	56,15	84,32
t_{max} , ч t_{max} , h	1,53	39,10	1,47	37,03	104,53
AUC_{0-t} , нг · ч/мл AUC_{0-t} , ng · h/ml	113,04	40,08	125,41	40,43	90,14
λ_z , ч ⁻¹ λ_z , h ⁻¹	0,04	49,67	0,04	40,61	103,65
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	21,72	34,50	22,05	33,49	98,53

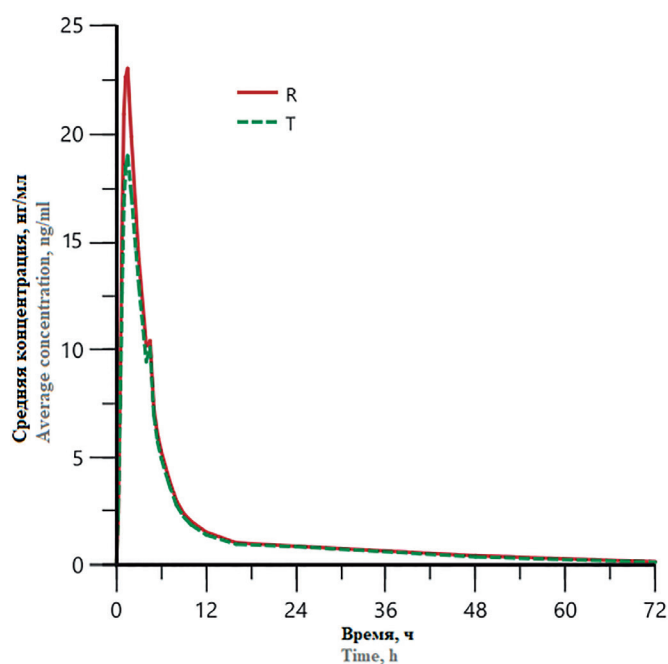


Рис. 6. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили **розувастатина** в плазме крови добровольцев после однократного приёма комбинированного **исследуемого** препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) в сравнении с приёмом монокомпонентного **референтного** препарата Крестор® (розувастатин, таблетки, 20 мг), Т – исследуемый (тестируемый) препарат, R – препарат сравнения (референтный)

Fig. 6. Mean pharmacokinetic profiles of **rosuvastatin** in the blood plasma of volunteers after a single dose of the **test** drug fixed-dose combination Losartan+amlodipine+rosuvastatin Sanofi (tablets, 100 mg + 5 mg + 20 mg) and **comparison** monocomponent drug Crestor® (rosuvastatin, tablets, 20 mg), T – test drug, R – comparison drug

Источник: Хохлов А.Л. и соавт., 2022
Source: Khokhlov AL et al., 2022

Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $AUC_{0-t}(T) / AUC_{0-t}(R)$, характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референтному, составило 99,25 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $C_{max}(T) / C_{max}(R)$, характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 94,30 %.

Фармакокинетические параметры амлодипина / Pharmacokinetic parameters of amlodipine

Фармакокинетические параметры амлодипина в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) представлены в табл. 3, а усреднённые фармакокинетические кривые представлены на рис. 3.

Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $AUC_{0-72}(T) / AUC_{0-72}(R)$, характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референтному, составило 101,92 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $C_{max}(T) / C_{max}(R)$, характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 99,78 %.

Фармакокинетические параметры амлодипина в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 100 мг 5 мг + 20 мг) представлены в табл. 4, а усреднённые фармакокинетические кривые представлены на рис. 4.

Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $AUC_{0-72}(T) / AUC_{0-72}(R)$, характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референтному, составило 101,76 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $C_{max}(T) / C_{max}(R)$, характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 102,57 %.

Фармакокинетические параметры розувастатина / Pharmacokinetic parameters of rosuvastatin

Фармакокинетические параметры розувастатина в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) представлены в табл. 5, а усреднённые фармакокинетические кривые представлены на рис. 5.

Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $AUC_{0-t}(T) / AUC_{0-t}(R)$, характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референтному, составило 101,31 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $C_{max}(T) / C_{max}(R)$, характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 97,58 %.

Фармакокинетические параметры розувастатина в исследовании биоэквивалентности препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) представлены в табл. 6, а усреднённые фармакокинетические кривые представлены на рис. 6.

Среднее арифметическое значение отношения фар-

макокинетических параметров $AUC_{0-t}(T) / AUC_{0-t}(R)$, характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референтному, составило 90,14 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $C_{max}(T) / C_{max}(R)$, характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 84,32 %.

Оценка биоэквивалентности / Bioequivalence assessment

Биоэквивалентность исследуемого и референтного препаратов оценивали на основании 90 % ДИ $\ln$ -преобразованных значений C_{max} , AUC_{0-72} (для амлодипина) и AUC_{0-t} (для лозартана и розувастатина) как основных параметров. Согласно протоколу, препараты считались биоэквивалентными, если границы оцененного ДИ для $AUC_{0-t/0-72}$ и C_{max} находились в пределах 80,00–125,00 %. В соответствии с протоколом исследования, 90 % ДИ для C_{max} лозартана и розувастатина находились в пределах расчётных, расширенных на основании подтверждённых данных о высокой вариабельности этого параметра, границ биоэквивалентности. Расширение диапазонов было выполнено в соответствии с предписаниями соответствующих руководств [14, 15]. Подробные данные представлены в табл. 7 и 8.

Закключение / Conclusion

В рамках регистрации комбинированного препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи проведено исследование его биоэквивалентности относительно совместно принимаемых препаратов Лозап® АМ (лозартан + амлодипин) и Крестор® (розувастатин) при однократном приёме здоровыми добровольцами 18–45 лет натошак. Исследования проводились для двух дозировок: лозартан + амлодипин + розувастатин, таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг и лозартан + амлодипин + розувастатин, таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг, соответственно. Таким образом, исследовали биоэквивалентность комбинированного препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) относительно совместно принимаемых препаратов Лозап® АМ (лозартан+амлодипин, таблетки, 50 мг + 5 мг) и Крестор® (розувастатин, таблетки, 10 мг), а также комбинированного препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) относительно совместно принимаемых препаратов Лозап® АМ (лозартан + амлодипин, таблетки, 100 мг + 5 мг) и Крестор® (розувастатин, таблетки, 20 мг) у здоровых добровольцев 18–45 лет после однократного приёма натошак.

На основании полученных данных можно констатировать, что исследуемые препараты характеризуются высокой степенью сходства показателей фармакокинетики. Индивидуальные и усреднённые

Таблица 7

ДИ для отношений фармакокинетических параметров $\text{Ln}(C_{\max})$, $\text{Ln}(AUC_{0-72})$ и $\text{Ln}(AUC_{0-t})$ в исследовании комбинированного препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 50 мг + 5 мг + 10 мг) (N – число измерений, CV_{wr} – коэффициент вариации для препарата сравнения, T – исследуемый препарат, R – препарат сравнения)

Table 7

CI for $\text{Ln}(C_{\max})$, $\text{Ln}(AUC_{0-72})$ and $\text{Ln}(AUC_{0-t})$ ratios fixed-dose combination Losartan + Amlodipine + Rosuvastatin Sanofi (tablets, 50 mg + 5 mg + 10 mg) (N – number of observations, CV_{wr} – reference formulation coefficient of variation, T – test formulation, R – reference formulation)

Параметр Parameter	Генеральное среднее (LSM) Least squares mean (LSM)		Отношение T/R (%) T/R ratio, (%)	90 % ДИ (%) 90 % CI (%)		БЭ BE	CVwr (%)
	T	R		Полученный Result	Границы приемлемости Acceptable range		
Лозартан (N = 248) Losartan							
Ln(AUC _{0-t})	431,1	432,2	99,74	96,96 – 102,60	80,00 – 125,00	ДА Yes	–
Ln (C _{max})	227,8	249,3	91,38	85,43 – 97,76	77,37 – 129,25**	ДА Yes	34,74*
Амлодипин (N = 244) Amlodipine							
Ln(AUC ₀₋₇₂)	105,3	103,7	101,49	99,27 – 103,76	80,00 – 125,00	ДА Yes	–
Ln (C _{max})	3,044	3,059	99,52	97,12 – 101,97	80,00 – 125,00	ДА Yes	12,20
Розувастатин (N = 248) Rosuvaststin							
Ln(AUC _{0-t})	57,85	57,55	100,5	95,36 – 105,95	80,00 – 125,00	ДА Yes	–
Ln (C _{max})	8,575	8,589	99,84	93,24 – 106,90	80,00 – 125,00	ДА Yes	28,07
Примечания: * – коэффициент вариации для препарата сравнения, позволяющий расширить границы приемлемости 90 % ДИ; ** – рас- ширенные границы приемлемости 90 % ДИ. Notes: * – coefficient of variation for the reference drug, allowing to extend the acceptance range 90 % CI; ** – extended the acceptance range 90 % CI							

Примечания: * – коэффициент вариации для препарата сравнения, позволяющий расширить границы приемлемости 90 % ДИ; ** – расширенные границы приемлемости 90 % ДИ.

Notes: * – coefficient of variation for the reference drug, allowing to extend the acceptance range 90 % CI; ** – extended the acceptance range 90 % CI.

Таблица 8

ДИ для отношений фармакокинетических параметров $\text{Ln}(C_{\max})$, $\text{Ln}(AUC_{0-72})$ и $\text{Ln}(AUC_{0-t})$ в исследовании комбинированного препарата Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи (таблетки, 100 мг + 5 мг + 20 мг) (N – число измерений, CV_{wr} – коэффициент вариации для препарата сравнения, T – исследуемый препарат, R – препарат сравнения)

Table 8

CI for $\text{Ln}(C_{\max})$, $\text{Ln}(AUC_{0-72})$ and $\text{Ln}(AUC_{0-t})$ ratios fixed-dose combination Losartan+Amlodipine+Rosuvastatin Sanofi (tablets, 100 mg + 5 mg + 20 mg) (N – number of observations, CV_{wr} – reference formulation coefficient of variation, T – test formulation, R – reference formulation)

Параметр Parameter	Генеральное среднее (LSM) Least squares mean (LSM)		Отношение T/R (%) T/R ratio, (%)	90 % ДИ (%) 90 % CI (%)		БЭ BE	CVwr (%)
	T	R		Полученный Result	Границы приемлемости Acceptable range		
Лозартан (N = 254) Losartan							
Ln(AUC _{0-t})	863,0	875,3	98,59	95,79 – 101,48	80,00 – 125,00	ДА Yes	—
Ln (C _{max})	523,1	563,8	92,78	86,30 – 99,74	77,45 – 129,12**	ДА Yes	34,60*
Амлодипин (N = 254) Amlodipine							
Ln(AUC ₀₋₇₂)	97,95	96,19	101,82	99,85 – 103,84	80,00 – 125,00	ДА Yes	—
Ln (C _{max})	2,823	2,769	101,97	99,50 – 104,49	80,00 – 125,00	ДА Yes	10,65
Розувастатин (N = 254) Rosuvastatin							
Ln(AUC _{0-t})	104,6	116,0	90,17	86,11 – 94,42	80,00 – 125,00	ДА Yes	—
Ln (C _{max})	19,63	23,03	85,23	79,52 – 91,34	76,38 – 130,92**	ДА Yes	36,59*
Примечания: * – коэффициент вариации для препарата сравнения, позволяющий расширить границы приемлемости 90 % ДИ; **– расширенные границы приемлемости 90 % ДИ.							
Notes: * – coefficient of variation for the reference drug, allowing to extend the acceptance range 90 % CI; ** – extended the acceptance range 90 % CI							

Примечания: * – коэффициент вариации для препарата сравнения, позволяющий расширить границы приемлемости 90 % ДИ; ** – расширенные границы приемлемости 90 % ДИ.

Notes: * – coefficient of variation for the reference drug, allowing to extend the acceptance range 90 % CI; ** – extended the acceptance range 90 % CI.

профили фармакокинетических кривых исследуемого и референтных препаратов для действующих веществ имеют совпадающие формы. Исследуемые препараты характеризуются близкими значениями относительной биодоступности и максимальной концентрации лозартана, амлодипина и розувастатина. 90 % ДИ находились в пределах диапазона биоэквивалентности для $C_{\max}$ (амлодипина), AUC_{0-72} (для амлодипина) и AUC_{0-t} (для лозартана и розувастатина). 90 % ДИ для $C_{\max}$ лозартана и розувастатина находились в пределах расчётных расширенных границ биоэквивалентности в соответствии с протоколом исследования.

Таким образом, выполненное исследование позволяет констатировать биоэквивалентность трёхкомпонентных препаратов Лозартан + амлодипин + розувастатин Санофи в сравнении с совместно принимаемыми препаратами Лозап® АМ (лозартан + амлодипин) и Крестор® (розувастатин).

Результаты описанных исследований биоэквивалентности послужили основанием для регистрации препарата Тристаниум® (АО Санофи, Россия) под номером ЛП-006864.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. Лебедева О.В. — координировала все этапы исследования биоэквивалентности; Хохлов А.Л., Хохлов А.А., Мирошников А.Е. — руководили клиническим этапом исследования, Гребенкин Д.Ю.,

Фаева Е.К., Казей В.И. — отвечали за аналитическую часть исследования, статистическую обработку, оформление рукописи и редакторскую поддержку.

Participation of authors. Lebedeva OV — coordinated all stages of the bioequivalence study; Khokhlov AL, Khokhlov AA, Miroshnikov AE — were responsible for the clinical phase of the study; Grebenkin DYU, Faeva EK, Kazey VI — carried out the analytical part of the study, carried out the statistical part of the study, wrote the text of the manuscript and made an editorial support.

Конфликт интересов. Исследование спонсировалось АО «Санофи-авентис групп», Лебедева О.В. является сотрудником данной компании. Авторы Гребенкин Д.Ю., Фаева Е.К., Казей В.И. представляют компанию ООО «Экзактэ Лабс»; Хохлов А.Л. представляет организацию ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет»; Хохлов А.А., Мирошников А.Е. представляют компанию ООО «КлинФармИнвест» — указанные организации выполняли данное контрактное исследование для АО «Санофи-авентис групп».

Conflict of interest. The study was sponsored by Sanofi and author Lebedeva OV is employee of Sanofi. Authors Grebenkin DYU, Faeva EK, Kazey VI represent LLC ExacteLabs; Khokhlov AL represents Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Yaroslavl State Medical University"; Khokhlov AA, Miroshnikov AE represent LLC ClinPharmInvest which were contracted by Sanofi for the conduction of the current study.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Хохлов Александр Леонидович

e-mail: al460935@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>

SPIN-код: 9389-8926

д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ярославль, Россия

Гребенкин Дмитрий Юрьевич

Автор, ответственный за переписку

e-mail: dmitrii.grebenkin@exactelabs.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9304-8000>

к. фарм. н., заведующий лабораторией фарм-анализа ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Россия

Фаева Екатерина Константиновна

e-mail: katyarsis@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8639-4316>

лаборант ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Россия

Khokhlov Alexander L.

e-mail: al460935@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>

SPIN code: 9389-8926

Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of the Clinical Pharmacology, Yaroslavl State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Yaroslavl, Russia

Grebenkin Dmitry Yu.

Corresponding author

e-mail: dmitrii.grebenkin@exactelabs.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9304-8000>

Cand. Sci. Pharm., Head of the farmanalysis laboratory, LLC ExacteLabs, Moscow, Russia

Faeva Ekaterina K.

e-mail: katyarsis@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8639-4316>

laboratory assistant, LLC ExacteLabs, Moscow, Russia

Казей Василий Игоревич

e-mail: vasily.kazey@exactelabs.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2032-6289>
 SPIN-код: 6253-0211
 к. б. н., генеральный директор ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Россия

Kazey Vasily I.

e-mail: vasily.kazey@exactelabs.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2032-6289>
 SPIN code: 6253-0211
 Cand. Sci. Biology., general manager LLC Exact-eLabs, Moscow, Russia

Хохлов Александр Александрович

e-mail: aa_khokhlov@cphinvest.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3307-0705>
 к. м. н., менеджер по клиническим исследованиям ООО «КлинФармИнвест», Ярославль, Россия

Khokhlov Alexander A.

e-mail: aa_khokhlov@cphinvest.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3307-0705>
 Cand. Sci. Med., clinical trials manager LLC ClinPharmInvest, Yaroslavl, Russia

Мирошников Алексей Евгеньевич

e-mail: ae_miroshnikov@cphinvest.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6657-3950>
 SPIN-код: 8896-8993
 к. м. н., ООО «КлинФармИнвест», Ярославль, Россия

Miroshnikov Alexei E.

e-mail: ae_miroshnikov@cphinvest.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6657-3950>
 SPIN code: 8896-8993
 Cand. Sci. Med., LLC ClinPharmInvest, Yaroslavl, Russia

Лебедева Ольга Владимировна

e-mail: Olga.Lebedeva@sanofi.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7983-685X>
 PhD, руководитель клинических проектов, Представительство АО «Санофи-авентис груп» (Франция), Москва, Россия

Lebedeva Olga V.

e-mail: Olga.Lebedeva@sanofi.com
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7983-685X>
 PhD, clinical project leader, Representative office of Sanofi (France), Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Harikrishnan S, Jeemon P, Mini GK, Thankappan KR et al. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1736–1788. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
2. Kotseva K, De Backer G, De Bacquer D, Rydén L et al. Lifestyle and impact on cardiovascular risk factor control in coronary patients across 27 countries: Results from the European Society of Cardiology ESC-EORP EUROASPIRE V registry. *European journal of preventive cardiology*. 2019;26(8):824–835. DOI: 10.1177/2047487318825350.
3. Dresser GK, Nelson SA, Mahon JL, Zou G et al. Simplified therapeutic intervention to control hypertension and hypercholesterolemia: a cluster randomized controlled trial (STITCH2). *J Hypertens*. 2013;31(8):1702–1713. DOI: 10.1097/HJH.0b013e3283619d6a.
4. Sniderman AD, Williams K, Contois JH, Monroe HM et al. A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2011;4(3):337–345. DOI: 10.1161/CIRCOUTCOMES.110.959247.
5. Satoh M, Ohkubo T, Asayama K, Murakami Y et al. Combined effect of blood pressure and total cholesterol levels on long-term risks of subtypes of cardiovascular death: evidence for cardiovascular prevention from observational cohorts in Japan. *Hypertension*. 2015;65(3):517–524. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04639.
6. Weber M. Clinical safety and tolerability of losartan. *Clin ther*. 1997;19(4):604–616. DOI: 10.1016/S0149-2918(97)80086-0.
7. Wadhwa RK, Steen DL, Khan I, Giugliano RP et al. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on

cardiovascular disease morbidity and mortality. *J clin Lipidol*. 2016;10(3):472–489. DOI: 10.1016/j.jacl.2015.11.010.

8. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C et al. AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA guideline on the management of blood cholesterol: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(24):e285–e350. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.11.003.

9. Carter NJ. Rosuvastatin. *American journal of cardiovascular drugs*. 2010;10(6):383–400.

10. Valcarcel Y, Jimenez R, Hernandez V, Aristegui R, Gil A. Efficacy and safety of amlodipine. *Clin Drug Investig*. 2006;26(3):125–133. DOI: 10.2165/00044011-200626030-00002.

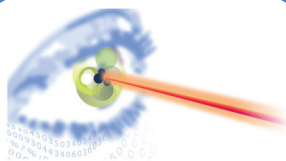
11. Lee HY, Kim SY, Choi KJ, Yoo BS et al. A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and the tolerability of a triple combination of amlodipine/losartan/rosuvastatin in patients with comorbid essential hypertension and hyperlipidemia. *Clin Ther*. 2017;39(12):2366–2379. DOI: 10.1016/j.clinthera.2017.10.013.

12. Mitra A, Wu Y. Challenges and opportunities in achieving bioequivalence for fixed-dose combination products. *AAPS J*. 2012;14(3):646–655. DOI: 10.1208/s12248-012-9378-x.

13. Dubey R. Bioequivalence challenges in development of fixed-dose combination products: looking beyond reformulation. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9(3):325–332. DOI: 10.1517/17425247.2012.655723.

14. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. — М.: Гриф и К; 2013; 280. [Mironov AN. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv. T. I. Moscow: Grif and K; 2013. (In Russ).].

15. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016. [Pravila provedeniya issledovaniy bioekvivalentnosti lekarstvennykh sredstv Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza. 2016. (In Russ).].



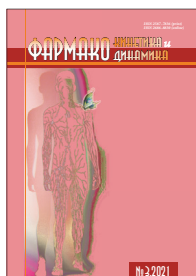
Издательство
ОКИ

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



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

Сайт журнала: www.clinvest.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru



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

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru



Журнал **«Реальная клиническая практика: данные и доказательства»** ставит своей целью предоставить средство для распространения и форум для обсуждения информации о том, как лекарственные препараты действуют в рутинной медицинской практике. Рубрики журнала включают как оригинальные исследования, так и обзоры использования реальных данных для оценки исходов лечения, принятия обоснованных медицинских решений в отношении лекарственных препаратов, медицинских изделий и других вмешательств.

Сайт журнала: www.myrwd.ru

20

Лет работы

230+

Исследований

220+

Публикаций

38

Партнёров

Комплексная оценка для включения в ограничительные перечни



Оценка эффективности и безопасности

- систематический обзор и метаанализ
- сетевой метаанализ



Фармакоэкономический анализ

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



Разработка моделей в MS Excel

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



Подготовка досье на включение в

- перечень ЖНВЛП
- перечень ОНЛС
- перечень ВЗН
- минимальный ассортимент

Также Центр занимается:

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

По вопросам сотрудничества обращаться к:



Белоусов Дмитрий Юрьевич

Генеральный директор

+ 7 (910) 449-22-73

clinvest@mail.ru



Чеберда Алексей Евгеньевич

Исполнительный директор

+ 7 (963) 999-77-69

aecheberda@healtheconomics.ru



Афанасьева Елена Владимировна

Финансовый директор

+ 7 (910) 400-88-87

eva88@list.ru