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

ФАРМАКОКИНЕТИКА и ФАРМАКОДИНАМИКА

Включен в перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ

№2.2022

www.PharmacoKinetica.ru

Центр
Фармакоэкономических
Исследований

+ 7 (926) 568-17-35
CLINVEST@MAIL.RU

www.HealthEconomics.ru

20	230+	220+	38
Лет работы	Исследований	Публикаций	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

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№2 2022

Издательство ОКИ

Подписано в печать 30.06.2022 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.PharmacoKinetica.ru Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) 04.02.2021 года свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-80349. ISSN 2587–7836. **Журнал включен в перечень ВАК.** Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№2
2022

Издательство
ОКИ

Signed in print 30.06.2022 r. **Circulation** 400 copies.
Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com
115093, Moscow, Partiynyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

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

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

Website: www.PharmacoKinetica.ru The journal was registered with the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) on 02/04/2021, the certificate of registration of the mass media PI No. FS 77-80349. ISSN 2587–7836. **The journal is included in the list of Higher Attestation Commission (HAC) of Russian Federation.** Copyring material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

CONTENTS

CONTENTS

Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 2. Блокаторы HCN-каналов

Мокров Г. В.

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

Аннотация. Управляемые циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемые каналы (HCN-каналы), прежде всего, их HCN4-подтип, являются одной из перспективных мишеней для разработки кардиопротекторных средств. Блокаторы HCN-каналов обладают селективным брадикардическим действием, сохраняя сократимость миокарда и диастолическую функцию и не оказывая влияния на электрофизиологические параметры сердца. Настоящий обзор продолжает серию обзоров по анализу соединений с кардиопротекторными свойствами в ряду биароматических структур, к которым относится и широкий ряд блокаторов HCN-каналов.

Ключевые слова: антиаритмики; кардиопротекторы; блокаторы HCN-каналов; биароматические соединения

Для цитирования:
Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 2. Блокаторы HCN-каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(2):03–10. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-03-10
Поступила: 05 мая 2022 г. **Принята:** 08 мая 2022 г. **Опубликована:** 30 июня 2022 г.

Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 2. HCN channel blockers

Mokrov GV

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide–gated (HCN) channels, primarily their HCN4 subtype, are one of the promising targets for the development of cardioprotective agents. HCN channel blockers have a selective bradycardic effect, preserving myocardial contractility and diastolic function and not affecting the electrophysiological parameters of the heart. This review continues a series of reviews on the analysis of compounds with cardioprotective properties in a number of biaromatic structures, which include a wide range of HCN channel blockers.

Keywords: antiarrhythmics; cardioprotectors; HCN-channels blockers; biaromatic compounds

For citations:
Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 2. HCN channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(2):03–10. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-03-10
Received: May 05, 2022. **Accepted:** May 08, 2022. **Published:** June 30, 2022

Список сокращений / List of abbreviations

CHO	Клетки яичника Китайского хомячка
DRG	Спинной корень ганглиев
EC	Эффективная концентрация
HCN	Циклически-нуклеотид-управляемый канал, активируемый гиперполяризацией
HEK	Клетки эмбриональной почки человека
IC_{50}	Полумаксимальная ингибирующая концентрация
I_{CaL}	Кальциевый ток L-типа
I_f	«Забавный» ток, электрический ток в сердце, протекающий по каналу HCN
I_K	Калиевый ток

Введение / Introduction

Настоящий обзор является второй частью серии обзоров, посвящённых рассмотрению кардиопротекторных средств с биароматической структурой, и в нём представлены блокаторы HCN-каналов.

Управляемые циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемые каналы (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels) представляют собой семейство неселективных катионных каналов, проводящих ионы натрия и калия через плазмалемму, генерирующих ток, называемый I_f (*funny* — забавный) в сердце или I_h (*hyperpolarizing* — гиперполяризирующий) или I_q (*query* — странный) в нейронах. HCN-каналы играют ключевую роль в контроле над сердечной и нейрональной ритмической активностью, обеспечивая функционирования токов-водителей ритма. Обозначения I_f и I_q данные токи получили из-за того, что их активация происходит при гиперполяризации, в то время как обычно ионные каналы активируются при деполяризации [1, 2].

Каналы HCN имеют типичную пространственную структуру, характерную для потенциал-зависимых калиевых каналов, состоящую из гомомерного или гетеромерного канала, образованного четырьмя субъединицами. У млекопитающих существует четыре изоформы каналов HCN (HCN1-HCN4), последовательность которых примерно на 60 % идентична друг другу [3].

HCN4 является основным подтипом канала HCN, присутствующим в синоатриальном узле (САУ), пейсмейкерной области сердца. В САУ каналы HCN4 активируются за счёт гиперполяризации после сердечного потенциала действия. Затем каналы HCN4 проводят направленный внутрь ток и деполяризуют клетку, что приводит к активации потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов, что, в свою очередь, обеспечивает срабатывание следующего сердечного потенциала действия [4, 5].

Поиски соединений группы «блокаторы каналов HCN» начались более 50 лет назад, ещё до самого открытия тока I_f, в рамках программы по созданию «специфических брадикардических средств». Значительно позже для первых представителей этой группы были определены характеристики их взаимодействия с HCN-каналом и его подтипами. Значительная часть разрабатываемых в различных исследовательских группах блокаторов HCN-каналов соответствуют обобщённой фармакофорной модели кардиопротекторов, представленной на рис. 1. Как уже описывалось в первом обзоре литературы [6], данная модель имеет следующие ключевые элементы: два ароматических цикла (отмечены красным) и линейный линкер (обозначен синим) различной длины, содержащий, как минимум, один гетероатом. В настоящем обзоре все соединения, соответствующие указанной фармакофорной модели, окрашены аналогичным образом: ароматические группы выделены красным цветом, а связывающий их линкер – синим (рис. 1).

Рис. 1. Обобщённая фармакофорная модель биароматических соединений, связанных линейным линкером, обладающих кардиопротекторными свойствами

Fig. 1. Generalized pharmacophore model of linked biaromatic cardioprotective agents

Примечание: Буква «X» в ликере указывает на наличие в нём хотя бы одного гетероатома.

Note: Letter "X" in the liker indicates the presence of at least one heteroatom in it.

Затебрадин и его аналоги / Zatebradin and its analogues

В конце 1970–1980-х гг. исследователи из компании Boeringher синтезировали серию производных фенилалкиламинов **1**, сконструированных на основе верапамила, с целью улучшения его отрицательной хронотропной активности и оптимизации других гемодинамических эффектов.

Оставив диметоксифенилароматические группы верапамила без изменений, авторы заменили фрагмент его спейсера, содержащий изопропильную и нитрильную группы, на лактамное кольцо различного размера, сопряжённое с одним из фенильных колец. Кроме того, проводилась оценка влияния на биологическое действие длины линкера и наличия в нём дополнительного гетероатома (рис. 2). Сначала в результате изучения связи структура–брадикардическая активность было отобрано соединение **фалипамил** с пирролидоновым кольцом. Путём расширения лактамного кольца до азепинонового соединения был получен **затебрадин**. Было обнаружено, что внутривенная (в/в) инъекция 5 мг/кг затебрадина анестезированным крысам примерно в 20 раз более эффективна в качестве брадикардического агента, чем фалипамил. Кроме того, затебрадин демонстрирует гораздо более высокую степень селективности, о чём свидетельствуют высокие значения отношений EC_{30} между сократительной способностью предсердий, сокращением аорты и частотой сокращений предсердий в сравнении с верапамилом, нифедипином и дилтиаземом [7].

Затебрадин был выпущен компанией Boehringer IngelheimPharma KG в качестве брадикардического средства с избирательным действием на ток водителя ритма в синусовом узле. Он снижает частоту сердечных сокращений (ЧСС) частотно-зависимым образом, практически не влияя на инотропизм как в животных моделях, так и у людей. Goethals и соавторы обнаружили, что затебрадин блокирует пейсмейкерный I_f-ток при низких концентрациях с минимальным влиянием на I_{CaL} и I_K. Таким образом, этот препарат был первым в классе «I_f -блокатором», применяемым в клинике для лечения ишемической болезни сердца [8].

Из-за определённых побочных эффектов, включая гипотензию, отрицательный инотропизм и нарушение зрения, а также из-за недостаточной эффективности, клиническая разработка затебрадина была прекращена [9].

Успех разработки затебрадина повлёк за собой ряд работ по поиску его активных аналогов как в компании Boehringer, так и в других группах. Первым направлением модификации молекулы затебрадина было изучение замены диметоксифенильного фармакофора на различные гетероциклы и варьирование длины алифатического линкера (соединения **2**). Среди производных этого типа наиболее активными оказались соединения, содержащие тиофеновые, бензотиофеновые и бензофурановые гетероциклы с длиной линкера (n) в 2–4 метиленовых звена. Соединение **Bomhard-33** из этого ряда сочетало в себе высокую брадикардическую эффективность и селективность с короткой продолжительностью действия [10]. Однако дальнейшего развития это направление не получило.

Другим направлением в поиске производных затебрадина в компании Boehringer было изучение введения в линкер циклического азотсодержащего фрагмента [11]. Анализ связи «структура–активность» соединений **3** как с разным размером кольца и длиной линкера, так и с разными ароматическими группами позволил выявить **килобардин**, который оказался близ-

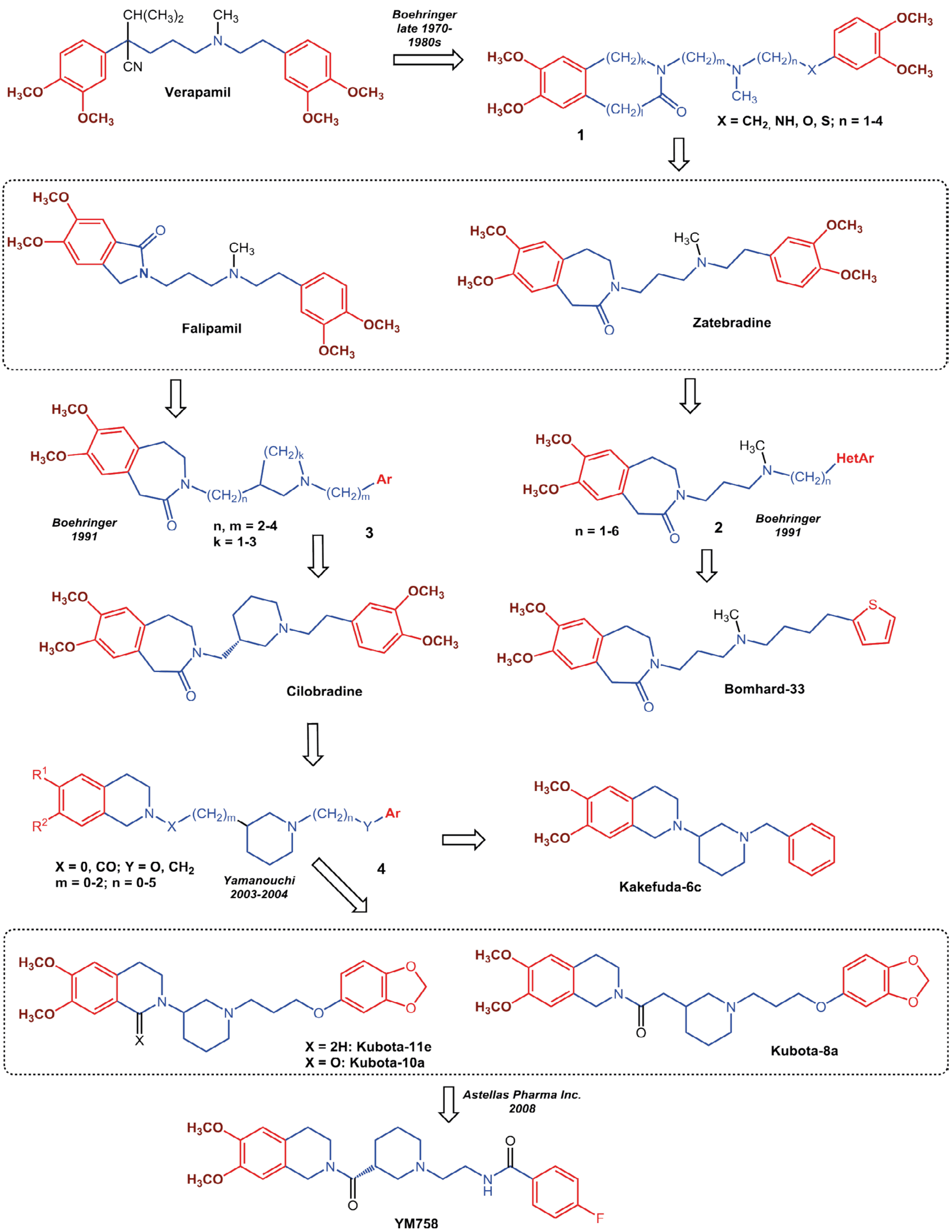


Рис. 2. Создание «специфических брадикардических средств» и блокаторов HCN-каналов в ряду аналогов затебрадина
Fig. 2. Creation of «specific bradycardic agents» and HCN channel blockers among zatebradin analogues

ким аналогом затебрадина, так как он имеет такую же длину линкера, связывающего ароматические группы, и те же 3,4-диметоксифенильные фармакофоры. Единственным отличием является наличие в линкере молекулы килобрадина пиперидинового кольца. Этот препарат эффективно снижал ЧСС, продлевал диастолу и снижал потребность миокарда в кислороде в различных моделях *in vivo* [12]. Килобрадин блокирует I_f более эффективно и быстрее по сравнению с затебрадином. Соответственно, килобрадин сильнее снижает скорость диастолической деполяризации пейсмейкера и частоту возбуждения клеток [13]. Эффекты килобрадина на HCN-каналы и I_f-ток в клетках САУ и *in vivo* продемонстрировали сходство в блокаде всех подтипов HCN-каналов и нативного I_f: значения IC_{50} для HCN1–HCN4 (клетки HEK293) находились в диапазоне 0,90–1,15 μM, а $IC_{50}(I_f)$ составлял 0,62 μM (выделенные клетки САУ мышей) [14]. Килобрадин изучался в клинических исследованиях, но его разработка, как и в случае затебрадина, была прекращена [15].

С 2003 года исследователи из Yamanouchi Pharmaceutical Co Ltd (Япония) занимаются поиском специфических брадикардических средств **4** на основе структур затебрадина и килобрадина. В этом случае бензоазепановое кольцо было заменено на тетрагидроизохинолиновое, а в центральной части линкера, как и в килобрадине, был использован пиперидиновый фрагмент. Длина линкера, связывающего ароматические части молекулы, варьировалась в широких пределах. Первым соединением в этой серии было **Kakefuda-6c**, показавшее наилучшие результаты в исследуемой серии по брадикардической активности в изолированном правом предсердии и у наркотизированных крыс. В отличие от килобрадина в молекуле Kakefuda-6c длина линкера, соединяющего ароматические части, была значительно короче и равнялась 7 связям [16].

Дальнейший поиск активных соединений исследовательской группой из Yamanouchi привёл к выявлению следующих соединений. Вещество **Kubota-11e** продемонстрировало более выраженную активность как *in vitro*, так и *in vivo*, со значением EC_{30} 0,25 μM (снижение на 30 % по сравнению с начальной частотой спонтанных сокращений в изолированном правом предсердии морских свинок) и снижением ЧСС на 47 % у анестезированных крыс в сравнении с затебрадином. Можно отметить, что в структуре Kubota-11e длина линкера соответствует таковой для килобрадина и затебрадина [17]. Карбонильный аналог Kubota-11e, соединение **Kubota-10a**, показало 4-кратное увеличение активности *in vitro* (EC_{30} = 0,067 μM) (снижение на 30 % по сравнению с исходной частотой спонтанных сокращений в правом предсердии морских свинок). Это вещество продемонстрировало высокую брадикардическую активность у крыс с минимальным влиянием на артериальное давление (АД) после перорального введения. Соединение также показало ингибирование I_f-тока (IC_{50} = 0,32 μM) в пейсмейкерных клетках морской свинки [18].

Дальнейший поиск производных соединения Kubota-10a путём увеличения длины линкера, связывающего ароматические фармакофоры, и изменения положения карбонильной группы позволил выявить соединение **Kubota-8a** с длиной линкера в 12 связей. Это соединение имело аналогичную активность *in vitro* (величина EC_{30} 0,07±0,01 μM в той же модели) и проявляло выраженную и высокоспецифическую брадикардическую активность как после внутривенного, так и после перорального введения [19].

Программа по поиску I_f-ингибиторов в качестве специфических брадикардических средств исследователями из Yamanouchi завершилась под эгидой Astellas Pharma Inc. Поиск активных производных соединений Kubota-11e, Kubota-10a и Kubota-8a привёл к созданию соединения **YM758**, которое содержит две амидные группы в линкере длиной 11 связей и атом фтора в свободной ароматической группе. YM758 разрабатывался для лечения стабильной стенокардии и фибрилляции предсердий компанией Astellas Pharma Inc. [20]. К сожалению, позже это соединение было снято с производства, вероятно, из-за фармакокинетических проблем [21].

Ивабрадин и его аналоги / Ivabradine and its analogues

В 1992 г. компания Servier (Франция) начала программу по поиску соединений с брадикардической активностью в ряду производных затебрадина **5**, в которых был сохранён диметоксифенильный фармакофор, сопряжённый с азепиноновым кольцом, а второй ароматический фармакофор был сконденсирован с циклоалкановым фрагментом (рис. 3). Наиболее активным соединением в этом ряду оказался **ивабрадин**, молекула которого очень близка к затебрадину и отличается только наличием циклобутанового фрагмента; длина линкера, связывающего ароматические фармакофоры, составляет 10 связей аналогично затебрадину [22]. Согласно более поздним исследованиям, ивабрадин является эффективным блокатором всех подтипов HCN-каналов (на клетках HEK293): IC_{50}(HCN1) = 2,05 μM; IC_{50}(HCN2) = 2,29 μM; IC_{50}(HCN3) = 2,51 μM; IC_{50}(HCN4) = 2,15 μM [14]. В другой работе приведены аналогичные данные: IC_{50}(HCN4) = 0,54 μM (клетки яичника китайского хомяка (CHO)) [23].

Ивабрадин по своему брадикардическому действию столь же эффективен, как и затебрадин, однако он оказался более специфичным, так как вызывал меньшее увеличение продолжительности потенциала действия [24]. Брадикардическое действие ивабрадина было показано в ряде животных моделей и не было связано с какими-либо признаками отрицательного инотропного действия [25, 26].

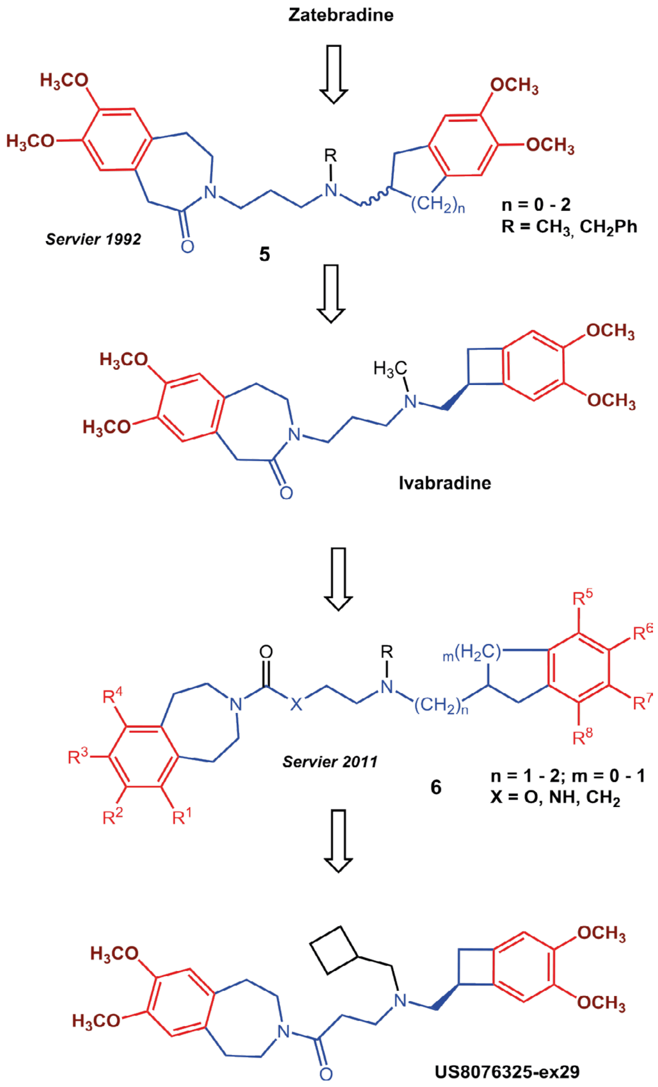


Рис. 3. Разработка ивабрадина и его аналогов
Fig. 3. Creation of ivabradine and its analogues

Ивабрадин был одобрен в 2005 г. Европейским агентством по оценке лекарственных препаратов (EMEA) для лечения хронической стабильной стенокардии и в 2015 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для лечения стабильной хронической сердечной недостаточности [27]. Руководство Европейского общества кардиологов (ESC) в 2016 г. также рекомендовало ивабрадин пациентам с сердечной недостаточностью с синусовым ритмом и фракцией выброса левого желудочка ≤35 %, ЧСС ≥70 и персистирующими симптомами [28].

На сегодняшний день ивабрадин является наиболее успешным из всех блокаторов HCN-каналов. Он продолжает активно и эффективно применяться в медицинской практике, постепенно расширяя спектр показаний, применяемых для лечения сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [29].

Наряду с успешной разработкой ивабрадина компания Servier продолжила исследования по поиску его активных производных. В 2011 году компания запатентовала группу соединений **6**, отличающуюся тем, что карбонильная группа из азепинонового кольца ивабрадина была перенесена на линейную часть молекулы. Другие компоненты молекулы варьировались довольно широко: длина спейсера, заместитель у атома азота, заместители в ароматических группах. Одним из наиболее активных соединений было **US8076325-ex29**, которое снижало начальную частоту сокращений правого предсердия крыс на 30 % при 0,4 μМ. Это соединение отличается от ивабрадина переносом карбонильной группы на линейную часть молекулы и наличием циклобутилметильного заместителя у атома азота [30].

Бензоазепановые аналоги затебрадина / Benzoazepane analogues of zatebradine

В 2001 г. *Bom A и соавт.* из Organon Laboratories Ltd (Шотландия) представили синтез аналогов затебрадина **7**, отличающихся наличием двойной связи в азепиновом кольце (рис. 4). Влияние дегидроаналогов затебрадина **7** на ЧСС изучали на изолированных предсердиях морских свинок. В этом ряду достоверной связи структура–активность выявлено не было, все соединения проявляли угнетение скорости ритма с разной степенью выраженности. Наибольшее действие оказывало соединение **Bom-8g**, содержащее метоксифенильный ароматический фармакофор и аллильный заместитель у атома азота, которое в концентрации 3 μМ ингибировало ЧСС на 80 %. Авторы подчёркивают, что наблюдаемый эффект может быть обусловлен не только блокадой I_f-канала, но и блокадой кальциевого канала L-типа [31].

В 2005 году группа учёных из Университета Флоренции исследовала аналогичные аналоги затебрадина **8**, характеризующиеся наличием одной или двух двойных связей в линкере, связывающем ароматические группы. Также авторы варьировали структуру свободной ароматической группы, длину линкера и анализировали добавление насыщенного алициклического или N-содержащего кольца, связанного со второй ароматической группой. Соединения сначала исследовали *in vitro* на их хронотропную активность на спонтанно сокращающемся правом предсердии морской свинки, затем активность некоторых из них по отношению к току I_f оценивали на изолированных желудочковых кардиомиоцитах старых крыс со спонтанной гипертензией. Испытания на правом предсердии морской свинки показали, что наличие двойной связи в кольце бензазепинона приводит к более эффективным соединениям, чем их насыщенные аналоги. В то же время сочетание второго ароматического кольца с пиперидином (**Romanelli-2**) и циклопентановым кольцом (**Romanelli-10**) даёт соединения лишь в 2–3 раза

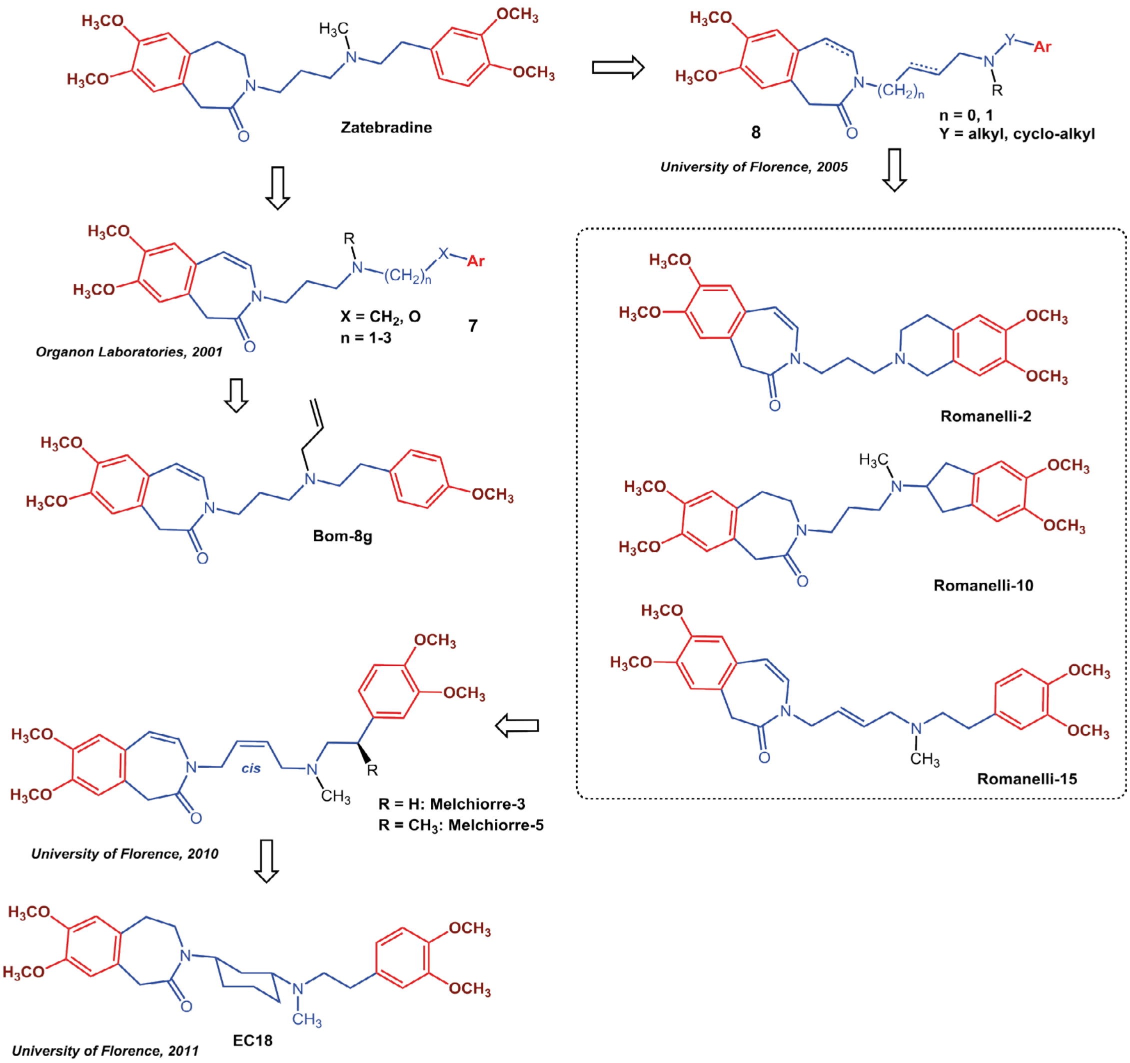


Рис. 4. Создание бензоазепановых аналогов затебрадина
Fig. 4. Development of benzoazepane zatebradine analogues

менее активные, чем затебрадин. Наиболее активным соединением оказалось **Romanelli-15**, отличающееся от затебрадина увеличением длины линкера на одно звено и наличием двух двойных связей: в азепановом кольце и в алифатической цепи. Romanelli-15 был равноэффективен с затебрадином: значения EC_{30} для отрицательной хронотропной активности составляли 11,3 μM и 13,4 μM, соответственно, а остаточный ток I_f составлял ~40 % от контроля при концентрации 10 μM для обоих препаратов [32].

В 2010-х годах исследователи из Университета Флоренции продолжили поиск активных аналогов Romanelli-15 с упором на поиск подтип-селективных блокаторов I_f с использованием новой модели скрининга (клетки HEK293, экспрессирующие рекомбинантные каналы mHCN1, mHCN2 и hHCN4). Было обнаружено, что соединения Romanelli-15, **Melchiorre-3** и **Melchiorre-5** способны блокировать I_f с активностью, аналогичной ивабрадину, по крайней мере, в отношении одной изоформы. Соединение Romanelli-15 преимущественно блокировало канал HCN1, его значения EC_{50} были для этого подтипа в 3 и 7 раз ниже, чем для HCN4 и HCN2, соответственно. Сдвиг конфигурации двойной связи с транс на цис изменил предпочтение к изоформам HCN, поскольку Melchiorre-3 был одинаково активен в отношении HCN1 и HCN4 и в 4 раза менее активен в отношении HCN2. Введение метильной группы в фенилэтильный фрагмент изменило профиль селективности Melchiorre-3: Melchiorre-5 был в 4 и 10 раз более активен в отношении HCN2, чем в отношении HCN1 и HCN4, соответственно. Все перечисленные соединения продемонстрировали близкие значения EC_{50} по снижению ЧСС в спонтанно сокращающихся изолированных предсердиях морской свинки (7,1–15,8 μM) [33].

С учётом полученных данных в последующей работе авторы представили соединение **EC18**, аналог зетебрадина и Melchiorre-3, содержащее циклогексановое кольцо в линкере. Это соединение продемонстрировало 5-кратное предпочтение к HCN4 по сравнению с HCN2 и HCN1 (EC_{50} (HCN4) = 3,98 µM). Примечательно, что обнаруженная в клетках HEK селективность к соединению EC18 сохранялась и в нативных тканях (САУ морской свинки, нейроны DRG мыши и спонтанно сокращающиеся предсердия морской свинки) [34].

Бензоксазиновые аналоги затебрадина / Benzoxazine analogues of zatebradine

Rieu JP с соавт. из Pierre-Fabre в 1993 г. описали группу бензоксазиновых аналогов затебрадина и фалипамила **9** (рис. 5). Одно из ароматических колец соединений **9** сконденсировано с насыщенным оксазиноновым кольцом, через которое оно связано азаалкановым линкером со вторым ароматическим кольцом. В качестве заместителей в ароматических кольцах использовались преимущественно метокси-группы, а также галогены или нитрогруппа.

Специфическую брадикардическую и антиаритмическую активность новых соединений оценивали на крысах. Оптимальная брадикардическая активность наблюдалась в соединениях, у которых ароматические кольца имели в качестве заместителей метокси-группы, а амин связывающей цепи был N-метилирован. N деметилированные и 2-алкилированные производные проявляли наибольшую антиаритмическую активность, но имели небольшой брадикардический эффект. Большинство описанных соединений действовали эффективнее, чем фалипамил. Было обнаружено, что наиболее активным соединением является **F3226**, который представляет собой полный оксазиновый аналог затебрадина и фалипамила. F3226 было выбрано для дальнейших фармакологических испытаний, и его брадикардическая активность была подтверждена при пероральном введении анестезированным крысам без заметных побочных эффектов. Соединение уменьшало ЧСС, и этот эффект был статистически значимым в течение 3 часов у анестезированных собак. F3226 было способен снижать ЧСС без снижения сократимости миокарда и улучшать доставку кислорода к миокарду за счёт увеличения времени диастолы. Эксперименты на анестезированных собаках показали, что F3226 не изменяет время внутрисердечной проводимости. Его единственным действием было удлинение электрической диастолы той части цикла, во время которой коронарный кровоток максимален. Клеточные электрофизиологические исследования показали специфическое действие на САУ [35].

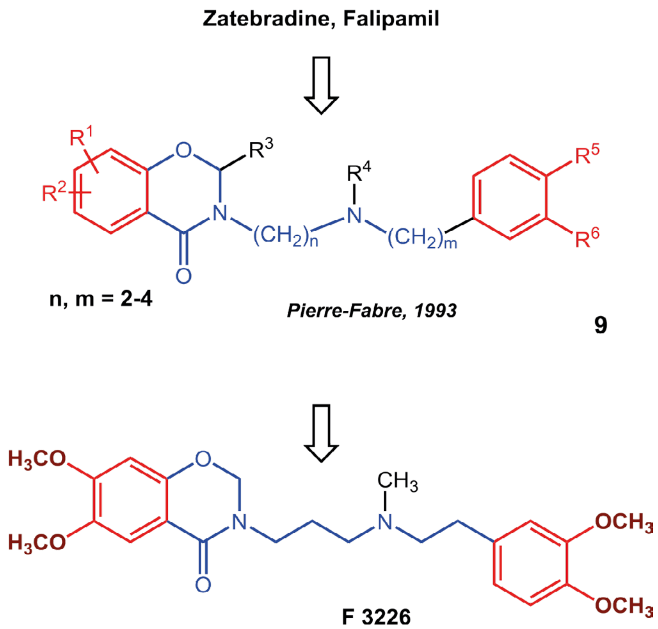


Рис. 5. Создание бензоксазиновых аналогов затебрадина
Fig. 5. Creation of benzoxazine zatebradine analogues

Выводы по блокаторам HCN-каналов / Conclusions on HCN channel blockers

В результате анализа литературы было установлено, что в серии биароматических соединений несколькими исследовательскими группами был выделен большой спектр соединений с блокирующей активностью каналов HCN. Практически все лидерные соединения в исследованных группах соответствуют достаточно определённой модели, представленной на рис. 6. Модель блокаторов каналов HCN содержит две ортодиметоксифенилароматические группы. Одна из этих групп связана с насыщенным или частично насыщенным лактамным кольцом, которое через атом азота связано со спейсером 1. Этот спейсер представляет собой либо линейную алифатическую цепь, либо содержит насыщенный циклический фрагмент. Спейсер 1 связан с центральным атомом азота, который либо содержит небольшой заместитель, либо входит в состав циклического фрагмента спейсера 1. Спейсер 2 связывает центральный атом азота со второй ароматической группой, и он имеет либо линейное строение, либо содержит небольшой алицикл, связанный с ароматической группой. Общая длина линкера, связывающего ароматические группы, составляет около 10 связей. Специфичность связывания молекул с подтипами рецепторов HCN в первую очередь определяется специфической структурой и геометрией спейсеров 1 и 2.

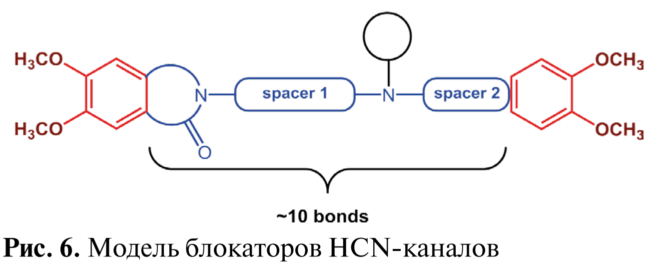


Рис. 6. Модель блокаторов HCN-каналов
Fig. 6. HCN channel blockers model

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

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

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

Список литературы / References

1. Postea O, Biel M. Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(12):903–914. DOI: 10.1038/NRD3576.

2. Larsson HP. How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle. *J Gen Physiol*. 2010;136(3):237–241. DOI: 10.1085/JGP.201010506.

3. Cao Y, Pang J, Zhou P. HCN channel as therapeutic targets for heart failure and pain. *Curr Top Med Chem*. 2015;16(16):1855–1861. DOI: 10.2174/1568026616666151215104058.

4. Roubille F, Tardif JC. New therapeutic targets in cardiology. *Circulation*. 2013;127(19):1986–1996. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000145.

5. Romanelli MN, Sartiani L, Masi A, et al. HCN channels modulators: the need for selectivity. *Curr Top Med Chem*. 2016;16(16):1764. DOI: 10.2174/1568026616999160315130832.

6. Мокров Г.В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 1. Блокаторы кальциевых каналов. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2022;(4):3-17. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 1. Calcium channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(4):3–17. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-4-3-17.

7. Reiffen M, Eberlein W, Mueller P, et al. Specific bradycardic agents. 1. Chemistry, pharmacology, and structure-activity relationships of substituted benzazepinones, a new class of compounds exerting antiischemic properties. *J Med Chem*. 1990;33(5):1496–1504. DOI: 10.1021/JM00167A033.

8. Goethals M, Raes A, Bogaert PP van. Use-dependent block of the pacemaker current I(f) in rabbit sinoatrial node cells by zatebradine (UL-FS 49). On the mode of action of sinus node inhibitors. *Circulation*. 1993;88(5):2389–2401. DOI: 10.1161/01.CIR.88.5.2389.

9. Glasser SP, Michie DD, Thadani U, Baiker WM. Effects of zatebradine (ULFS 49 CL), a sinus node inhibitor, on heart rate and exercise duration in chronic stable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 1997;79(10):1401–1405. DOI: 10.1016/S000-2914(99)X0015-0.

10. Bomhard A, Reiffen M, Heider J, Psiorz M, Lillie C. Specific bradycardic agents. 2. Heteroaromatic modifications in the side chain of specific bradycardic benzazepinones: chemistry, pharmacology, and structure-activity relationships. *J Med Chem*. 1991;34(3):942–947. DOI: 10.1021/JM00107A011.

11. Lillie C, Kobinger W. US Patent 5175157. 1990;352(552).

12. Granetzny A, Schwanke U, Schmitz C, et al. Pharmacologic heart rate reduction: effect of a novel, specific bradycardic agent on the heart. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;46(02):63–69. DOI: 10.1055/S-2007-1010191.

13. Van Bogaert PP, Pittoors F. Use-dependent blockade of cardiac pacemaker current (If) by cilobradine and zatebradine. *Eur J Pharmacol*. 2003;478(2-3):161–171. DOI: 10.1016/J.EJPHAR.2003.08.083.

14. Stieber J, Wieland K, Stöckl G, Ludwig A, Hofmann F. Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors. *Mol Pharmacol*. 2006;69(4):1328–1337. DOI: 10.1124/MOL.105.020701.

15. Vélez de Mendizábal N, Staab A, Schäfer HG, et al. Joint population pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the heart rate effects at rest and at the end of exercise for cilobradine. *Pharm Res*. 2012;30(4):1110–1122. DOI: 10.1007/S11095-012-0947-6.

16. Kakefuda A, Watanabe T, Taguchi Y, Masuda N, Tanaka A, Yanagisawa I. Synthesis and pharmacological evaluation of 2-(3-Piperidyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives as specific bradycardic agents. *Chem Pharm Bull*. 2003;51(4):390–398. DOI: 10.1248/CPB.51.390.

17. Kubota H, Kakefuda A, Watanabe T, et al. (±)-2-(3-Piperidyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines as a new class of specific bradycardic agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(13):2155–2158. DOI: 10.1016/S0960-894X(03)00349-4.

18. Kubota H, Kakefuda A, Watanabe T, et al. Synthesis and Pharmacological evaluation of 1-Oxo-2-(3-piperidyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines and related analogues as a new class of specific bradycardic agents possessing if channel inhibitory activity. *J Med Chem*. 2003;46(22):4728–4740. DOI: 10.1021/JM0301742.

19. Kubota H, Watanabe T, Kakefuda A, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of N-acyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives as novel specific bradycardic agents. *Bioorg Med Chem*. 2004;12(5):871–882. DOI: 10.1016/J.BMC.2003.12.032.

20. Umehara KI, Susaki Y, van Teylingen RHJ, et al. Evaluation of the inhibitory and induction potential of YM758, a novel If channel inhibitor, for human P450-mediated metabolism. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;33(4):211–223. DOI: 10.1007/BF03190875.

21. Nakada N. Investigation of metabolite profile of YM758, a novel if channel inhibitor. *Drugs R D*. 2016;16(2):205–216. DOI: 10.1007/S40268-016-0130-3.

22. Peglion JL, Vian J, Vilaine JP, Villeneuve N, Janiak P, Bidouard JP. US Patent 5296482. Published online 1994.

23. Thollon C, Bedut S, Villeneuve N, et al. Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. *Br J Pharmacol*. 2007;150(1):37–46. DOI: 10.1038/SJ.BJP.0706940.

24. Thollon C, Cambarrat C, Vian J, Prost JF, Peglion JL, Vilaine JP. Electrophysiological effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49. *Br J Pharmacol*. 1994;112(1):37–42. DOI: 10.1111/J.1476-5381.1994.TB13025.X.

25. Simon L, Ghaleh B, Puybasset L, Giudicelli JF, Berdeaux A. Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;275(2):659–666.

26. Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Acute and chronic cardiac and regional haemodynamic effects of the novel bradycardic agent, S16257, in conscious rats. *Br J Pharmacol*. 1995;115(4):579–586. DOI: 10.1111/J.1476-5381.1995.TB14971.X.

27. Psotka MA, Teerlink JR. Ivabradine. *Circulation*. 2016;133(21):2066–2075. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018094.

28. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2016;18(8):891–975. DOI: 10.1002/EJHF.592.

29. Chen C, Kaur G, Mehta PK, et al. Ivabradine in Cardiovascular Disease Management Revisited: a Review. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2021;35(5):1045–1056. DOI: 10.1007/S10557-020-07124-4.

30. Peglion JL, Goument B, Dessinges A, et al. US Patent 8076325 B2. Published online 2011.

31. Bom A, Booth S, Bruin J, Clark J, Miller S, Wathey B. Parallel solid-phase synthesis of zatebradine analogues as potential I(f) channel blockers. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001;11(17):2351–2354. DOI: 10.1016/S0960-894X(01)00424-3.

32. Romanelli MN, Cerbai E, Dei S, et al. Design, synthesis and preliminary biological evaluation of zatebradine analogues as potential blockers of the hyperpolarization-activated current. *Bioorg Med Chem*. 2005;13(4):1211–1220. DOI: 10.1016/J.BMC.2004.11.017.

33. Melchiorre M, Lungo M Del, Guandalini L, et al. Design, synthesis, and preliminary biological evaluation of new isoform-selective f-current blockers. *J Med Chem*. 2010;53(18):6773–6777. DOI: 10.1021/JM1006758.

34. Del Lungo M, Melchiorre M, Guandalini L, et al. Novel blockers of hyperpolarization-activated current with isoform selectivity in recombinant cells and native tissue. *Br J Pharmacol*. 2012;166(2):602–616. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01782.x.

35. Rieu JP, Duflos A, Tristani JC, et al. Synthesis and bradycardic activity of a series of substituted 3-Aminoalkyl-2,3-dihydro-4H-1,3-benzoxazin-4-ones as potent antiischemics. *Eur J Med Chem*. 1993;28(9):683–691. DOI: 10.1002/CHIN.199404190.

Влияние максимального электрошока и противосудорожных препаратов на концентрацию продуктов перекисного окисления липидов в эксперименте на мышах

Гайдуков И. О., Литвинова С. А., Золотов Н. Н., Котельникова С. О., Воронина Т. А

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

Аннотация. Окислительный стресс играет одну из ключевых ролей в эпилептогенезе. Целью исследования было оценить влияние судорог на развитие оксидативного стресса и наличие антиоксидантных свойств у карбамазепина и вальпроевой кислоты при судорожном состоянии, вызванном максимальным электрошоком (МЭШ). *Методы*. У мышей вызывали электросудорожные припадки методом МЭШ с оценкой тяжести судорог по балльной шкале. Оценку оксидативного стресса проводили по продуктам перекисного окисления липидов (ПОЛ), определяемых в плазме крови. *Результаты*. Установлено, что воздействие МЭШ с последующими тонико-клоническими припадками приводит к оксидативному стрессу у мышей. Вальпроевая кислота и карбамазепин полностью защищали от возникновения судорог после воздействия МЭШ, однако концентрация продуктов ПОЛ не отличалась от группы с МЭШ и была также выше, чем в группе контроля.

Ключевые слова: МЭШ; карбамазепин; вальпроевая кислота; окислительный стресс; ПОЛ; ТБК-активные продукты

Для цитирования:
Гайдуков И. О., Литвинова С. А., Золотов Н. Н., Котельникова С. О., Воронина Т. А. Влияние максимального электрошока и противосудорожных препаратов на концентрацию продуктов перекисного окисления липидов в эксперименте на мышах. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(2): 11–16. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-11-16
Поступила: 05 мая 2022 г.. **Принята:** 08 мая 2022 г. **Опубликована:** 30 июня 2022 г..

The effect of maximal electroshock seizure and anticonvulsants on the concentration of lipid peroxidation products in an experiment in mice

Gaydukov IO, Litvinova SA, Zolotov NN, Kotelnikova SO, Voronina TA
FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. Oxidative stress plays a key role in epileptogenesis. The aim of the study was to evaluate the effect of seizures on the development of oxidative stress and the presence of antioxidant properties in carbamazepine and valproic acid in convulsive state caused by maximal electroshock seizure (MES). *Methods.* An electroconvulsive seizure were induced by the MES-test in mice, with assessment of the severity of seizures on a point scale. Oxidative stress was assessed by products of lipid peroxidation (LPO) determined in blood plasma. *Results*. It has been established that exposure to MES followed by tonic-clonic seizures leads to oxidative stress in mice. Valproic acid and carbamazepine completely protected against seizures after MES-test, however, the concentration of lipid peroxidation products did not differ from the MES group and was also higher than in the control group.

Keywords: MES; carbamazepine; valproic acid; oxidative stress; lipid peroxidation; TBA-active products

For citations:
Gaydukov IO, Litvinova SA, Zolotov NN, Kotelnikova SO, Voronina TA. The effect of maximal electroshock seizure and anticonvulsants on the concentration of lipid peroxidation products in an experiment in mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(2):11–16. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-11-16
Received: May 05, 2022. **Accepted:** May 08, 2022. **Published:** June 30, 2022

Введение / Introduction

Головной мозг составляет всего 2 % от массы тела и при этом расходует более 20 % поступающего в организм кислорода и в связи с этим наиболее подвержен окислительному стрессу. Мозг также содержит высокие концентрации полиненасыщенных жирных кислот, которые склонны к перекисному окислению липидов, богат железом, которое может катализировать образование гидроксильных радикалов. Окислительный стресс возникает при различных неврологических заболеваниях и нейродегенеративных расстройствах, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, эпилепсия и др. [1]. Реактивные формы кислорода/оксида азота вызывают перекисное окисление липидов и повреждение митохондриальной ДНК. Эти процессы приводят к перестройке нейронных цепей, нейродегенерации, повышению возбудимости и снижению судорожного порога [2]. Установлено, что в клинической практике длительная монотерапия вальпроевой кислотой приводит к значительному снижению маркеров оксидативного стресса [3]. Однако в экспериментах при остром введении реактивные метаболиты карбамазепина, вальпроевой кислоты, фенитоина, фенобарбитала могут индуцировать активные формы кислорода и способствовать гибели клеток нейронов [4–9].

Целью исследования явилось изучение влияния максимального электрошока и противосудорожных препаратов на концентрацию продуктов перекисного окисления липидов как маркера оксидативного стресса в плазме крови мышей.

Материалы и методы / Materials and methods

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах массой 20–26 г., полученных из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая» (Московская область). В работе использовали следующие вещества: вальпроевая кислота (ВК) (Sigma Aldrich), карбамазепин (Sigma Aldrich). Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (протокол № 6 от 16 апреля 2018 г.).

Эксперимент представлял собой последовательность нескольких основных этапов (рис. 1).

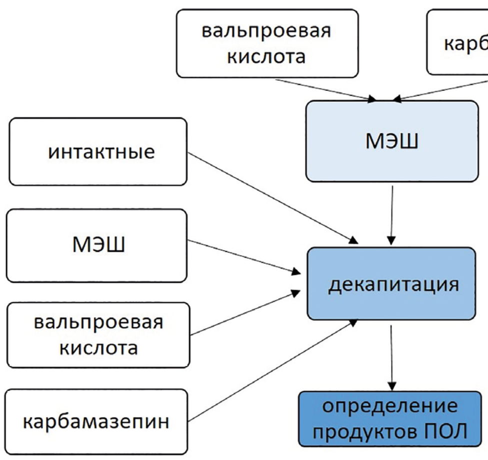


Рис. 1. Схема эксперимента
Fig. 1. Scheme of experiment
Примечание: МЭШ – максимальный электрошок; ПОЛ – перекисное окисление липидов.
Notes: MES – maximum electricshock; LPO – lipid peroxidation.

Мышей делили на группы по 10 шт. в каждой: интактные, МЭШ, вальпроевая кислота (ВК) (200 мг/кг), карбамазепин (15 мг/кг), вальпроевая кислота (200 мг/кг) + МЭШ, карбамазепин (15 мг/кг) + МЭШ.

Соединения вводили в течение 4 дней и за 30 минут до начала эксперимента.

На первом этапе проводили тест судорог, вызванных максимальным электрошоком (МЭШ), с оценкой судорог по балльной шкале. Эффект оценивали в зависимости от тяжести припадка и противосудорожного эффекта соединений по изменению среднего балла относительно значений контроля (МЭШ). Затем проводили декапитацию во всех группах животных с последующим забором образцов крови (см. рис. 1).

На втором этапе проводился количественный анализ ТБК-активных продуктов как (конечный продукт окисления) показателя оксидативного стресса (см. рис. 1).

В дополнительном эксперименте проводили оценку влияния МЭШ-индуцированных судорог на выживаемость животных в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъёме (баночной гипоксии).

Тест максимального электрошока. Животные через корнеальные (глазные) электроды получали электрические стимулы (режим 250/300 V/mA: 11 mA, длительность 0,2 с). Для генерации электрических импульсов использовалась сертифицированная установка «Rodent Shocker RS» type 221 (Harvard Apparatus, GmbH, Германия). В балльной системе оценивали следующие показатели степени выраженности судорожного припадка: 1 балл – одиночное подергивание тела мыши; 2 балла – клонические судороги; 3 балла – тонические судороги; 4 балла – гибель животного. Подсчитывали суммарное количество баллов. Критерием эффективности являлось уменьшение суммарного среднего балльного показателя.

Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией в гермообъёме (баночная гипоксия). Мышей поодиночке помещали в герметически закрываемые банки объёмом 200 см^3. Животных, подвергавшихся МЭШ, помещали в банки через 2 часа после воздействия током. Регистрировали время гибели до агонального вздоха.

Забор биоматериала. Декапитацию выживших животных проводили через 5 мин, 30 мин, 2 и 4 часа после воздействия электрическим стимулом (МЭШ). Плазму крови немедленно отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Затем плазма крови пипеткой отбиралась в пробирки и замораживалась при температуре – 20 °С.

Количественное определение продуктов ПОЛ в плазме крови. Метод определения продуктов ПОЛ, одним из которых является малоновый диальдегид (МДА), концентрация которого повышается при оксидативном стрессе, основан на взаимодействии с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). При высокой температуре и кислом значении pH реакция протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса. Максимум поглощения комплекса приходится на 532 нм с коэффициентом молярной экстинкции $\varepsilon = 1{,}56 \times 105$ М$^{-1}$ см$^{-1}$.

К 20 мкл предварительно размороженной плазмы крови добавляли 20 мкл 0,485М соли Мора и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Затем к образцам добавляли 1060 мкл 0,9 % раствора 2-тиобарбитуровой кислоты (Serva, Германия) в 50 % уксусной кислоте и инкубировали при 80 °С в течение 60 мин. После охлаждения измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре DU-50 (Beckman Coulter, США) при 532 нм с длиной пути 10 мм. Расчёт количества комплекса с ТБК проводили на основании значения коэффициента молярной экстинкции $\varepsilon = 1{,}56 \times 105$ М$^{-1}$ см$^{-1}$. Все измерения проводили в 2 параллелях.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия Краскела–Уоллиса для выявления межгрупповых различий; критерия Ньюмена–Кейлса и критерия Данна для апостериорных сравнений средних.

Результаты / Results

По результатам теста МЭШ установлено, что среднебалльная оценка судорог имеет различия между группами. В ходе статистической обработки подтверждено достоверное влияние внутригруппового фактора (критерий Краскела–Уоллиса, $P < 0{,}001$). В группе МЭШ у всех животных наблюдались клонико-тонические припадки. При апостериорных сравнениях средних с группой контроля (МЭШ) наблюдалось достоверное уменьшение среднего балла в группах животных, получавших вальпроевую кислоту и карбамазепин (рис. 2). Карбамазепин полностью защищал от развития тонических и клонических судорог у мышей. Вальпроевая кислота также устраняла тонические судороги и практически полностью клонические, немного уступая по выраженности противосудорожного эффекта карбамазепину.

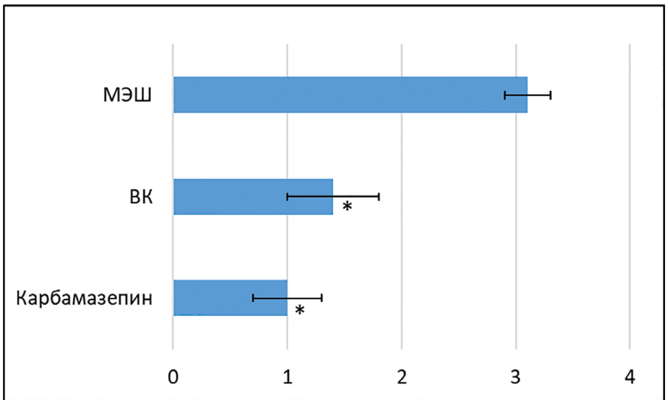


Рис. 2. Противосудорожный эффект вальпроевой кислоты и карбамазепина в тесте максимального электрошока по суммарному количеству баллов

Fig. 2. Anticonvulsant effect of valproic acid and carbamazepine in the maximal electroshock test by the total number of points

Примечания: ВК – вальпроевая кислота; МЭШ – максимальный электрошок; * – достоверность отличий в сравнении с группой контроля (МЭШ), при $P < 0{,}05$ (критерий Данна); по оси абсцисс – балльная оценка судорог (меньше – лучше).

Notes: ВК – VPA – valproic acid; МЭШ – MES – maximal electroshock; * – reliability at $P < 0.05$ in comparison with the control group (MES) (the Dunn's test); along the abscissa axis – evaluation of seizures in points (less is better).

В результате определения концентрации продуктов ПОЛ в плазме крови мышей наблюдалось изменение концентрации ТБК-активных продуктов. В ходе статистической обработки было подтверждено достоверное влияние внутригруппового фактора (ANOVA, $P < 0{,}05$). Концентрация ТБК-активных продуктов в группе МЭШ (5 мин) достоверно отличалась от группы контроля, что свидетельствовало об оксидативном стрессе в условиях патологии (рис. 3). Стоит отметить, что в группах с более поздней декапитацией после МЭШ (30 мин, 2 и 4 ч), концентрация ПОЛ уменьшалась до уровня интактных животных (см. рис. 3).

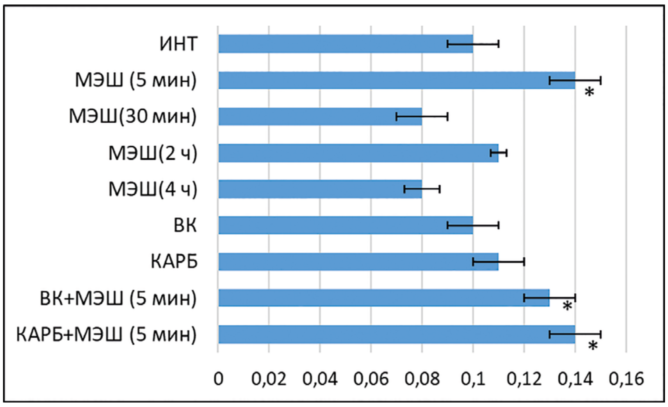


Рис. 3. Влияние максимального электрошока, вальпроевой кислоты и карбамазепина на концентрацию ТБК-активных продуктов в плазме крови мышей

Fig. 3. The effect of maximal electroshock, valproic acid and carbamazepine on the concentration of TBA-active products in the blood plasma of mice

Примечания: по оси абсцисс–концентрации ТБК-активных продуктов в плазме мкМ/л, MEAN ± SEM; ВК – вальпроевая кислота; ИНТ – интактные (контроль); МЭШ – максимальный электрошок; КАРБ – карбамазепин; * – достоверность отличий от группы контроля, при $P < 0{,}05$ (критерий Ньюмена–Кейлса).

Notes: along the abscissa axis – concentrations of TBA-active products in plasma mcM/l, MEAN ± SEM; ВК – VPA – valproic acid; ИНТ – INT – intact (control group); МЭШ – MES – maximal electroshock; КАРБ – CBZ – Carbamazepine; * – reliability at $P < 0.05$ in comparison with the control group (Newman–Keuls test).

Концентрация ПОЛ в плазме при применении вальпроевой кислоты и карбамазепина не менялась после электросудорожного воздействия относительно значений контрольной группы (МЭШ) (см. рис. 3). ВК и карбамазепин не вызывали изменение концентрации ПОЛ и без МЭШ (см. рис. 3). Таким образом, соединения не влияли на концентрацию ПОЛ в плазме при судорогах, вызванных МЭШ, и без индукции МЭШ.

В условиях модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией (баночная гипоксия) установлено, что воздействие МЭШ приводит к уменьшению средней продолжительности жизни мышей (рис. 4). Однако концентрация ТБК-активных продуктов через 2 часа после МЭШ не отличалась от группы контроля (контроль 0,10 мкМ/л, после МЭШ – 0,11 мкМ/л). Отсутствие эффекта МЭШ на концентрацию ТБК-активных продуктов возможно связано с тем, что МЭШ дополнительно приводит к активации циклооксигиназы-2 и, как следствие, микроваскулярному воспалению. Известно, что выделение тромбоксана А2 приводит к вазоконстрикции через 8-изопростагландин-F2α, что в свою очередь ухудшает мозговой кровоток и ишимизацию головного мозга [10, 11]. Простагландин F2α мог

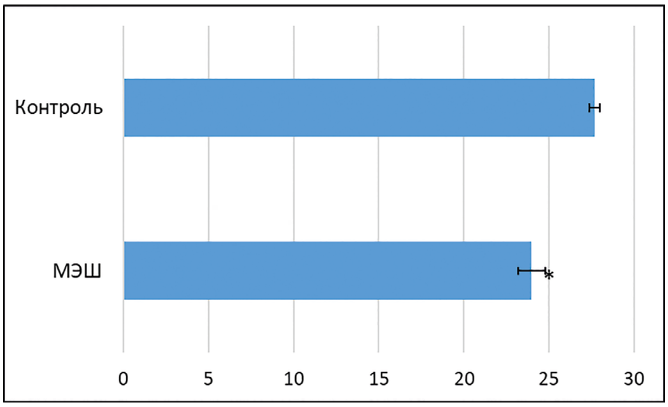


Рис. 4. Время жизни мышей, подвергнутых МЭШ, в условиях гипоксии с гиперкапнией

Fig. 4. The lifetime of mice subjected to MES in conditions of acute hypoxia with hypercapnia

Примечания: * – достоверность отличий от группы контроля, при $P < 0,05$ (критерий Ньюмена–Кейлса); ось абсцисс – средняя продолжительности жизни, с.

Notes: * – reliability at $P < 0.05$ in comparison with the control group (Newman–Keuls test); along the abscissa axis – average life duration, s.

бы быть дополнительным маркером оксидативного стресса в данной модели и исследовании корреляции с ТБК-активными продуктами.

Обсуждение / Discussion

Повреждение головного мозга, возникающее в результате судорог, является динамическим процессом, включающим множество факторов, способствующих гибели нейрональных клеток. В частности, это генетические факторы, митохондриальная дисфункция, вызванная эксайтотоксичностью, и оксидативный стресс [2]. Судорожная активность инициирует приток Ca^{2+} через NMDA и Ca^{2+}-зависимые каналы, что приводит к биохимическим каскадам, которые запускаю гибель нейронов [12–14]. В норме, присутствие Ca^{2+} необходимо для поддержания синтеза АТФ, однако патологический стимул может приводить к изменению физиологической функции Ca^{2+}. Перегрузка митохондриального матрикса Ca^{2+} приводит к усиленному образованию активных форм кислорода (АФК) через ступенчатое восстановление O_2 ($O_2 \rightarrow O^{2-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow OH \rightarrow H_2O$), которые могут повреждать клеточные компоненты, такие как белки, липиды и ДНК, приводить к гибели клетки [15]. Помимо дыхательной цепи, АФК образовываются за счёт активации НАДФН$_2$-оксидазы, являющейся источником супероксидного-анион-радикала [16]. Активные формы кислорода инактивируются антиоксидантными ферментами, такими как супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталаза, однако активность этих ферментов в головном мозге значительно снижена в связи с особенностью его физиологии, что ограничивает антиоксидантную защиту головного мозга [14, 17].

Участие АФК и окислительного стресса в развитии судорог косвенно подтверждается противосудорожной активностью антиоксидантов. Мелатонин дозозависимо подавляет эпилептические разряды после инъекции в сенсомоторную кору хлорида железа крысам [18], а интрацеребровентрикулярное введение глутатиона подавляет судороги, вызванные коразолом у мышей [19]. Окислительный стресс также связан с судорогами, вызванными электрическим током, и связанным увеличением продуктов ПОЛ [20, 21]. Сообщалось, что тонические приступы, вызванные МЭШ, вызывают значительное снижение глутатион пероксидазы в головном мозге и плазме, которое коррелирует с увеличением перекисного окисления липидов и падением общей антиоксидантной ёмкости [22].

В результате проведённого исследования установлено, что максимальный электрошок приводит к увеличению концентрации продуктов ПОЛ в плазме крови и оксидативному стрессу, соответственно. Восстановление концентрации продуктов ПОЛ через некоторое время после МЭШ до уровня контрольных значений указывает на активацию антиоксидантных систем организма как минимум через 30 мин после воздействия током. В опыте *in vivo* МЭШ уменьшал время жизни мышей в условиях гипоксии.

Защита от МЭШ-индукцированных судорог при применении вальпроевой кислоты и карбамазепина не приводила к снижению ТБК-активных продуктов в плазме животных. Препараты также не влияли на их концентрацию в плазме животных, не подвергавшихся электрошоку. Полученные данные указывают на отсутствие антиоксидантного компонента у вальпроевой кислоты и карбамазепина. Повышенный уровень ТБК-активных продуктов в группах мышей, перенёсших судороги и получавших вальпроевую кислоту или карбамазепин, может быть связан с особенностью данной модели в связи с её травматичностью или прооксидантными свойствами используемых препаратов. Показано, что при остром введении препаратов реактивные метаболиты карбамазепина, вальпроевой кислоты, фенитоина, фенобарбитала могут индуцировать АФК и способствовать гибели клеток нейронов [4–9]. В экспериментальных и клинических исследованиях вальпроевая кислота снижает активность супероксиддисмутазы, а карбамазепин – каталазы и супероксиддисмутазы [23–25]. Однако в клинических исследованиях монотерапия вальпроевой кислотой в течение 6 и 12 месяцев приводила к значительному снижению маркеров оксидативного стресса, в том числе продуктов перекисного окисления липидов, таких как МДА, и увеличению активности супероксиддисмутазы и каталазы [3].

Таким образом, максимальный электрошок вызывает увеличение концентрации ТБК-активных продуктов ПОЛ в плазме крови мышей. Вальпроевая кислота и карбамазепин не влияют на оксидативный стресс при воздействии МЭШ и концентрацию продуктов ПОЛ в условиях нормы, что свидетельствует об отсутствии антиоксидантного компонента у этих препаратов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Гайдуков Игорь Олегович
Автор, ответственный за переписку
e-mail: gaidukov01@rambler.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8056-4142
к. б. н., с. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Gaydukov Igor O.
Corresponding author
e-mail: gaidukov01@rambler.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8056-4142
PhD Biological Sci., Senior researcher of laboratory psychopharmacology FSBI «Zakusov institute of pharmacology», Moscow, Russia

Литвинова Светлана Александровна
e-mail: sa_litvinova@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9139-2334
к. б. н., в. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Litvinova Svetlana A.
e-mail: sa_litvinova@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9139-2334
PhD Biological Sci., Leading researcher Laboratory of Psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Золотов Николай Николаевич
e-mail: zolotovnn@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-3528-4659
д. б. н., профессор, гл. н. с, лаборатории психофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Zolotov Nikolay N.
e-mail: zolotovnn@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-3528-4659
Dr. Sci. Biological, professor, Chief researcher of laboratory psychopharmacology FSBI «Zakusov institute of pharmacology», Moscow, Russia

Котельникова Светлана Олеговна
e-mail: ailantha@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7083-5298
к. б. н., с. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kotelnikova Svetlana O.
e-mail: ailantha@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7083-5298
PhD Biological Sci., Senior researcher, laboratory of psychopharmacology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Воронина Татьяна Александровна
e-mail: voroninata38@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-3566-6203
SPIN-код: 5766-3452
д. м. н., профессор, руководитель лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Voronina Tatiana A.
e-mail: voroninata38@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-3566-6203
SPIN code: 5766-3452
Dr. Sci. (Med.), professor, Head Laboratory of psychopharmacology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Aguiar CC, Almeida AB, Araújo PV, de Abreu RN, et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review. *Oxid Med Cellr Longev*. 2012;2012:795259. DOI: 10.1155/2012/795259.

2. Ferriero DM. Protecting neurons. *Epilepsia*. 2005;46(7):45–51. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2005.00302.x.

3. Beltrán-Sarmiento E, Arregoitia-Sarabia CK, Floriano-Sánchez E, et al. Effects of valproate monotherapy on the oxidant-antioxidant status in mexican epileptic children: a longitudinal study. *Oxid Med Cellr Longev*. 2018;2018:7954371. DOI: 10.1155/2018/7954371.

4. Yuksel A, Cengiz, M, Seven M, et al. Erythrocyte glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children with valproate and carbamazepine monotherapy. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2000;11(1):73–81. DOI: 10.1515/jbcpp.2000.11.1.73.

5. Verrotti, A, Basciani F, Trotta D, et al. Serum copper, zinc, selenium, glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels in epileptic children before and after 1 year of sodium valproate and carbamazepine therapy. *Epilepsy Res*. 2002;48(1-2):71–75. DOI: 10.1016/s0920-1211(01)00322-9.

6. Liu CS, Wu HM, Kao SH, et al. Serum trace elements, glutathione, copper/zinc superoxide dismutase, and lipid peroxidation in epileptic patients with phenytoin or carbamazepine monotherapy. *Clin Neuropharmacol*. 1998;21(1):62–64.

7. Aycicek A., Iscan A. The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children. *Eur Neurol*. 2007;57(2):65–69. DOI: 10.1159/000098053.

8. Higuchi S, Yano A, Takai S, et al. Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci*. 2012;130(1):4–16. DOI: 10.1093/toxsci/kfs222.

9. Lu W, Uetrecht JP. Peroxidase-mediated bioactivation of hydroxylated metabolites of carbamazepine and phenytoin. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(8):1624–1636. DOI: 10.1124/dmd.107.019554.

10. Brault S, Martinez-Bermudez AK, Marrache AM, et al. Selective Neuromicrovascular Endothelial Cell Death by 8-Iso-Prostaglandin F2: Possible Role in Ischemic Brain Injury. *Stroke*. 2003;34(3):776–782. DOI: 10.1161/01.STR.0000055763.76479.E6.

11. Cam Ha TT, Antis GG, G. Campbell T, et al. Seizures elevate gliovascular unit Ca^{2+} and cause sustained vasoconstriction. *JCI Insight*. 2020;5(19):e136469. DOI: 10.1172/jci.insight.136469.

12. Van Den Pol AN, Obrietan K., Belousov A. Glutamate hyperexcitability and seizure-like activity throughout the brain and spinal cord upon relief from chronic glutamate receptor blockade in culture. *Neuroscience*. 1996;74(3):653–674. DOI: 10.1016/0306-4522(96)00153-4.

13. Francisco JC, Hayley AM, Waldo C. Role of NMDA Receptor-Mediated Glutamatergic Signaling in Chronic and Acute Neuropathologies. *Neural Plast*. 2016;(2016):2701526. DOI: 10.1155/2016/2701526.

14. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992;59(5):1609–1623. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x.

15. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford Univ. Press; 1999

16. Chen H, Song YS, Chan PH. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(7):1262–1272. DOI: 10.1038/jcbfm.2009.47.

17. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213–219. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x.

18. Kabuto H, Yokoi I, Ogawa N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. *Epilepsia*. 1998;39(3):237–243. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1998.tb01367.x.

19. Abe K, Nakanishi K, Saito H. The anticonvulsive effect of glutathione in mice. *Biol Pharm Bull*. 1999;22(11):1177–1179. DOI: 10.1248/bpb.22.1177.

20. Rola R, Swiader M, Czuczwar SJ. Electroconvulsions elevate the levels of lipid peroxidation products in mice. *Pol J Pharmacol*. 2002;54(5): 521–524.

21. Barichello T, Bonatto F, Agostinho FR, et al. Structure-related oxidative damage in rat brain after acute and chronic electroshock. *Neurochem Res*. 2004;29(9):1749–1753. DOI: 10.1023/b:nere.0000035811.06277.b3.

22. Nieoczym D, Albera E, Kankofer M, et al. Maximal electroshock induces changes in some markers of oxidative stress in mice. *J Neural Transm (Vienna)*. 2008;115(1):19–25. DOI: 10.1007/s00702-007-0805-6.

23. Niketic V, Ristic S, Saicic ZS, et al. Activities of antioxidant enzymes and formation of the glutathione adduct of hemoglobin (Hb ASSG) in epileptic patients with long-term antiepileptic therapy. *Farmaco*. 1995;50(11):811–813.

24. El-Shenawy NS, Hamza RZ. Nephrotoxicity of sodium valproate and protective role of L-cysteine in rats at biochemical and histological levels. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2016;27(5):497–504. DOI: 10.1515/jbcpp-2015-0106.

25. Arora T, Mehta AK, Sharma KK, et al. Effect of Carbamazepine and Lamotrigine on Cognitive Function and Oxidative Stress in Brain during Chemical Epileptogenesis in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009;106(5):372–377. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2009.00499.x.

Кинетика распределения кардиопротектора АЛМ-802 в органах и тканях крыс

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

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

Аннотация. Изучена кинетика распределения соединения, обладающего кардиопротекторной активностью, N1-(2,3,4-триметоксибензил)-N2-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина (АЛМ-802) в тканях и органах крыс после однократного внутрижелудочного введения в дозе 100 мг/кг. Определены величины тканевой доступности АЛМ-802. Тканевая доступность АЛМ-802 падает в ряду: почки→печень→сердце→ селезёнка→скелетная мышца→головной мозг (129,3; 27,2; 20,9; 15,3; 5,9 и 0,3, соответственно). Установлено, что АЛМ-802 выводится из организма животных достаточно медленно: значения k_{el} варьировали от 0,0252 до 0,0885 $ч^{-1}$, значения MRT составили 7,6–59,3 ч.

Ключевые слова: кардиопротектор; АЛМ-802; фармакокинетика; тканевая доступность; ВЭЖХ-масс-спектрометрия

Для цитирования:
Кравцова О. Ю., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Бочков П. О., Жердев В. П. Кинетика распределения кардиопротектора АЛМ-802 в органах и тканях крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(2):17–22. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-17-22
Поступила: 02 июня 2022 г. **Принята:** 08 июня 2022 г. **Опубликована:** 30 июня 2022 г.

Disribution kinetics of cardioprotector ALM-802 in rat organs and tissues

Kravtsova OYu, Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Zherdev VP

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The distribution kinetics of a compound with cardioprotective activity, N1-(2,3,4-trimethoxybenzyl)-N2-{2-[(2,3,4-trimethoxybenzyl)amino] ethyl}-1,2-ethanediamine (ALM-802) in rat tissues and organs after single intragastric administration at a dose of 100 mg/kg. The values of ALM-802 tissue availability were determined. Tissue availability of ALM-802 falls in a row: kidneys→liver→heart→spleen→skeletal muscle→brain (129.3; 27.2; 20.9; 15.3; 5.9 and 0.3, respectively). It was found that ALM-802 is excreted from the body rather slowly: k_{el} values ranged from 0.0252 to 0.0885 h^{-1}, MRT values were 7.6–59.3 h.

Keywords: cardioprotector; ALM-802; pharmacokinetics; tissue availability; HPLC/mass- spectrometry

For citations:
Kravtsova OYu, Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Zherdev VP. Disribution kinetics of cardioprotector ALM-802 in rat organs and tissues. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(2):17–22. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-17-22
Received: June 02, 2022. **Accepted:** June 08, 2022. **Published:** June 30, 2022

Введение / Introduction

Важным и обязательным этапом при проведении фармакокинетических исследований является изучение тканевой доступности (fт) новых оригинальных лекарственных средств (ЛС). Основным результатом процессов распределения является транспорт ЛС в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими эффект ЛС. На основании определения величины *f*т возможна количественная оценка интенсивности проникновения действующего вещества в периферические ткани [1].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезировано соединение N_1-(2,3,4-триметоксибензил)-N_2-{2-[(2,3,4-триметоксибензил) амино]этил}-1,2-этандиамина (в виде тригидрохлорида) с рабочим шифром АЛМ-802, которое по своей кардиопротективной активности, изученной на животных с интактным сосудистым руслом, как минимум, не уступает эталонному препарату триметазидину [2–5].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении кинетики распределения потенциального кардиопротектора АЛМ-802 в органах и тканях крыс после однократного внутрижелудочного (в/ж) введения в дозе 100 мг/кг.

Материалы и методы исследования / Materials and methods

В работе использовали субстанции, синтезированные в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»: N_1-(2,3,4-триметоксибензил)-N_2-{2-[(2,3,4-триметоксибензил) амино]этил}-1,2-этандиамина (в виде тригидрохлорида) с рабочим шифром АЛМ-802 (серия 270421; рис. 1) [7].

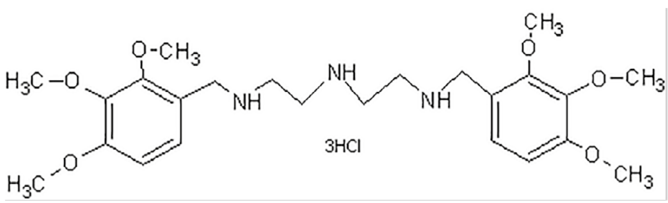


Рис. 1. Структурная формула АЛМ-802
Fig. 1. ALM-802 Structural formula

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

Изучение кинетики распределения АЛМ-802 в органах и тканях крыс проводили после однократного в/ж введения фармацевтической субстанции в дозе 100 мг/кг. Исследуемое вещество вводили в виде суспензии в 1 % крахмальном клейстере.

Содержание АЛМ-802 определяли в плазме крови и гомогенатах органов до введения исследуемого вещества (контроль) и через 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48 и 72 ч после введения. Образцы крови крыс получали декапитацией животных с последующим центрифугированием при 13500 об/мин в течение 15 мин для отделения плазмы. У всех декапитированных животных также изымали: цельный головной мозг, селезёнку, левую долю печени, левую почку, скелетную мышцу (бедро), сердце. Органы промывали в холодной деионизованной воде и обсушивали на фильтровальной бумаге, затем взвешивали и фиксировали массу в протоколе. Далее органы (за исключением печени) гомогенизировали с помощью гомогенизатора тканей с добавлением 2-кратного объёма деионизованной воды (печень гомогенизировали с добавлением 4-кратного объёма деионизованной воды). Полученные гомогенаты центрифугировали при 13500 об/мин в течение 15 мин, затем отобранный супернатант и образцы плазмы крови замораживали при –40 °C и хранили без добавления консервантов до анализа.

Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены в соответствии с нормативной документацией (ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014), касающейся гуманного обращения с животными, и стандартными операционными процедурами лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Проведение экспериментов с животными одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Для количественного определения АЛМ-802 в плазме крови и гомогенатах органов/тканей животных использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием. Нижний предел количественного определения составил 1 нг/мл (г) для АЛМ-802 [6]. Полученные концентрации АЛМ-802 (нг/мл(г)) в образцах были рассчитаны с учётом всех разведений, которым подвергались пробы органов и тканей в ходе пробоподготовки.

Расчёт фармакокинетических (ФК) параметров АЛМ-802 проводили немодельным методом. ФК кривые («концентрация лекарственного вещества/метаболита – время») были построены по усреднённым значениям концентраций АЛМ-802 в органах и тканях в дискретные интервалы времени, полученным у 5 животных в каждый временной интервал.

Основные расчётные ФК параметры: AUC_{0-t}, $AUC_{0-\infty}$ площадь под ФК кривой (площадь под кривой концентрация – время); T_{max} — время достижения максимальной концентрации исследуемого соединения в плазме крови; C_{max} — максимальная концентрация; MRT — среднее время удерживания исследуемого соединения в организме; k_{el} — константа скорости элиминации; $t_{1/2el}$ — период полувыведения исследуемого соединения. fт — тканевая доступность — величина, характеризующая интенсивность распределения вещества в органах и тканях, рассчитывается по формуле:

$$f\text{т} = AUC\text{т}_{0\text{-t last}}/AUC\text{p}_{0\text{-t last}},$$

где: $AUC\text{т}_{0\text{-t last}}$ — AUC в ткани/органа и $AUC\text{p}_{0\text{-t last}}$ — AUC в плазме крови, рассчитанные для одного и того же t_{last} [1].

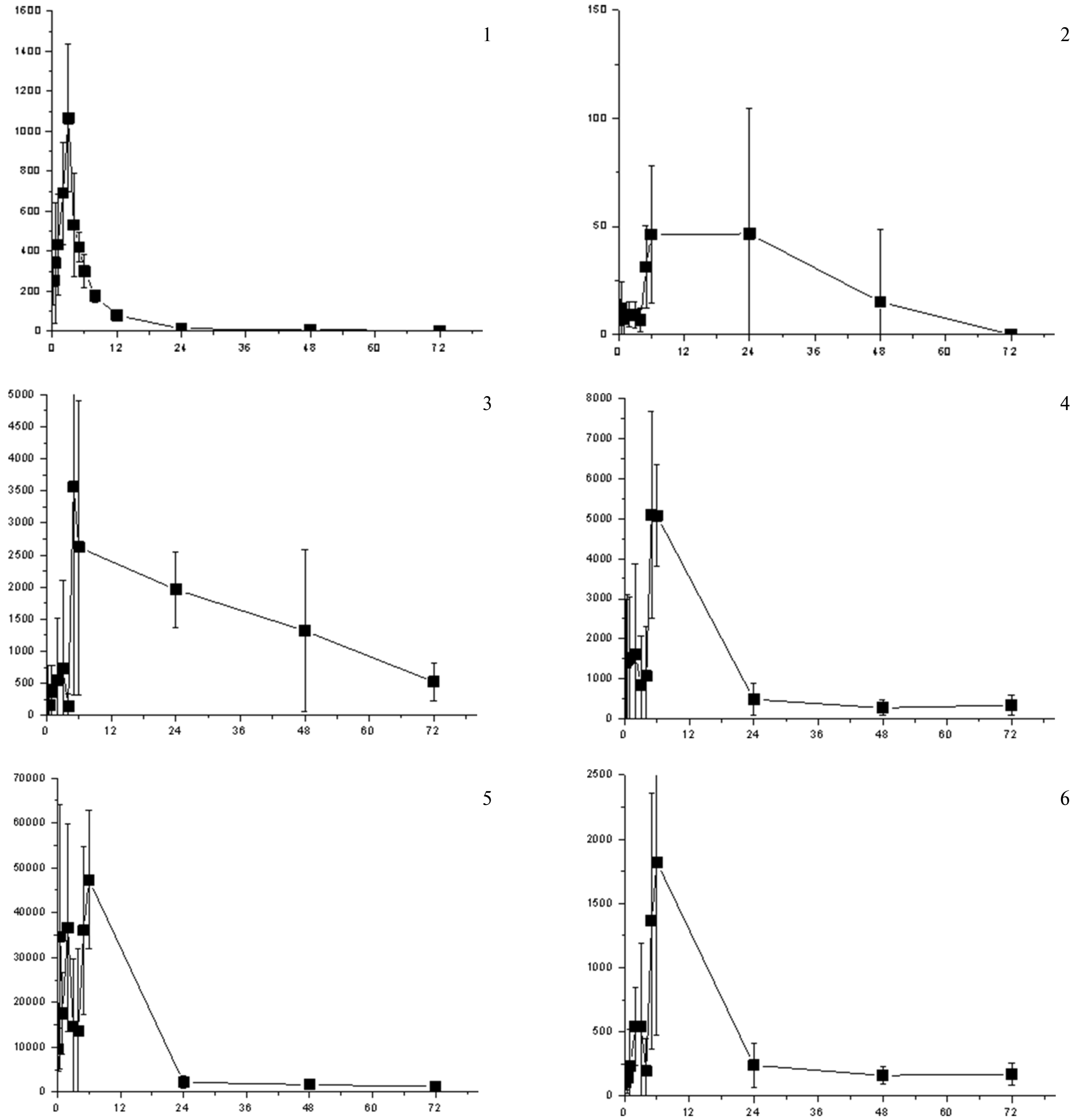
Результаты и их обсуждение / Results and discussion

Распределение соединения АЛМ-802 изучали в органах и тканях, отличающихся друг от друга степенью кровоснабжения (селезёнка, скелетные мышцы, сердце, головной мозг), органах, обеспечивающих элиминацию (печень, почки).

В распределении кардиопротектора по органам прослеживается значительная гетерогенность. Установлено, что АЛМ-802 плохо проникает через ГЭБ, так величина AUC в головном мозге в десятки раз меньше, чем в других органах.

Усреднённые ФК профили АЛМ-802 в органах и тканях крыс после однократного в/ж введения представлены на рис. 2.

Поскольку ФК кривые построены по средним значениям, при расчётах ФК параметров отсутствует статистическая обработка результатов. ФК характеристики исследуемого соединения в органах/тканях животных представлены в табл. 1. Изучаемое соединение определялось в органах на протяжении 72 ч. T_{max} АЛМ-802 в исследуемых органах составило 3–6 ч, за исключением головного мозга (T_{max} = 24 ч) (табл. 1). Значения C_{max} кардиопротектора возрастали в ряду: головной мозг → плазма крови → скелетная мышца → печень → сердце → селезёнка → почки (46,6; 1064,8; 1821,6; 3481,9; 3561,6; 5088,3 и 47352,8 нг/мл (г), соответственно). Значения $AUC_{0\text{-t last}}$ АЛМ-802 возрастали в ряду: головной мозг → плазма крови → скелетная мышца → селезёнка → сердце → печень → почки (1669; 5243; 31112; 79984; 109516; 142544 и 677833 нг/мл (г), соответственно). Анализ величин fт АЛМ-802 показал, что исследуемое вещество распределяется в хорошо васкуляризированные органы (почки, печень, селезёнка) и в орган-мишень — сердце. Так, тканевая доступность АЛМ-802 в системе «почки/плазма крови» составила 129,3; «печень/плазма крови» — 27,2; «селезёнка/плазма крови» — 15,3, при этом «сердце/плазма крови» — 20,9. Таким образом, fт АЛМ-802



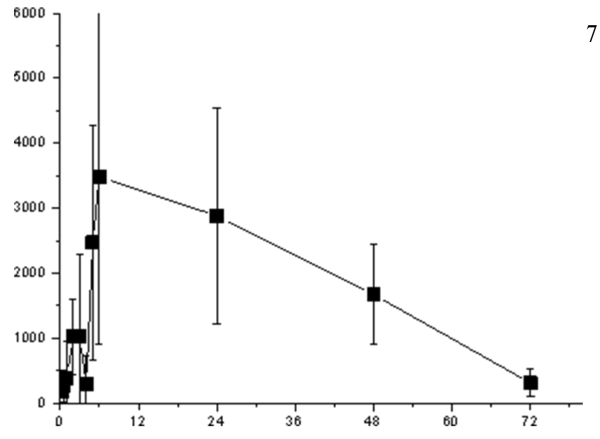


Рис. 2. Профили АЛМ-802 в органах и тканях крыс после однократного в/ж введения в дозе 100 мг/кг:
1 — плазма крови; 2 — головной мозг; 3 — сердце; 4 — селезёнка; 5 — почки; 6 — скелетные мышцы; 7 — печень (*n* = 5; среднее±стандартное отклонение; по оси абсцисс — время, ч; по оси ординат – концентрация, нг/мл (г))

Fig. 2. ALM-802 Profiles in rat organs and tissues after single intragastral administration at dose 100 mg/kg:
1 — blood plasma; 2 — brain; 3 — heart; 4 — spleen; 5 — kidney; 6 — skeletal muscle and 7 — liver (*n* = 5; mean±standard deviation; the abscissa — time in hours; the ordinate –– concentration, ng/ml (g))

Таблица 1

Фармакокинетические параметры АЛМ-802 в органах и тканях крыс после однократного внутрижелудочного введения фармацевтической субстанции АЛМ-802 в дозе 100 мг/кг

Table 1

Pharmacokinetic parameters of ALM-802 in rat organs and tissues after a single intragastric administration of the ALM-802 pharmaceutical substance at dose of 100 mg/kg

Параметры / Parameters	Единицы измерения / Units	Органы и ткани/Organs and tissues						
		Плазма крови / Blood plasma	Головной мозг / Brain	Сердце / Heart	Селезёнка / Spleen	Почки / Kidney	Скелетная мышца / Sceletal muscle	Печень / Liver
C_{max}	нг/мл	1064,8	46,6	3561,6	5088,3	47352,8	1821,6	3481,9
T_{max}	ч	3,0	24,0	5,0	5,0	6,0	6,0	6,0
$AUC_{0\to t\ last}$ (t_{last} = 72 ч)	нг/мл(г)×ч	5243	1669	109516	79984	677833	31112	142544
$AUC_{0\to\infty}$	нг/мл(г)×ч	5258	2210	130250	123238	699665	36429	39608
k_{el}	$ч^{-1}$	0,0885	0,0279	0,0252	0,0431	0,0542	0,0322	0,0360
$t_{1/2el}$	ч	7,8	24,9	27,5	16,1	12,8	21,52	19,26
MRT	ч	7,6	36,4	59,3	13,4	12,9	30,6	35,7
*f*т		–	0,3	20,9	15,3	129,3	5,9	27,2

в сердце была соизмерима с тканевой доступностью в печени — органе, обеспечивающим элиминацию и хорошо васкуляризированном (рис. 3). Вообще, *f*т — величина относительная, значение её не зависит от способа введения исследуемого вещества и обусловливается исключительно его физико-химическими свойствами [5] (см. табл. 1).

Анализ ФК параметров, характеризующих элиминацию изучаемого соединения, позволяет заключить, что АЛМ-802 выводится из организма животных достаточно медленно: значения k_{el} варьировали от 0,0252 до 0,0885 $ч^{-1}$, а величины MRT составили 7,6 — 59,3 ч.

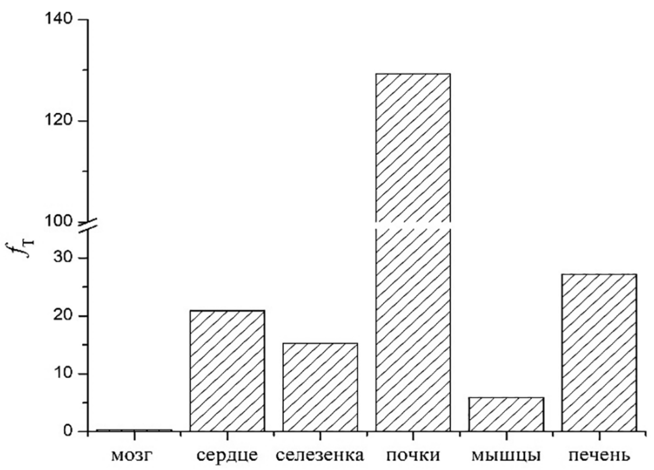


Рис. 3. Тканевая доступность (*f*т) АЛМ-802 в тканях и органах крыс после однократного в/ж введения в дозе 100 мг/кг

Fig. 3. ALM-802 Tissue availability (*f*т) in rat organs and tissues after single intragastral administration at a dose 100 mg/kg

Выводы / Conclusion

1. Соединение АЛМ-802 распределяется по органам и тканям неравномерно. Тканевая доступность изучаемого соединения в системе «головной мозг/плазма крови» составила 0,3; «печень/плазма крови» — 27,2; «почки/плазма крови» — 129,3. В органе-мишени — сердце — тканевая доступность АЛМ-802 составила 20,9.
2. Интенсивность проникновения АЛМ-802 в органы и ткани снижается в ряду: почки→печень→сердце→селезёнка→скелетная мышца→головной мозг.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № FGFG-2022-0003 «Изучение патофизиологических механизмов формирования алкоголь-обусловленной патологии сердца и поиск молекулярных мишеней для фармакологической коррекции выявленных нарушений».

Financing. The work was carried out within the framework of State task No. FGFG-2022-0003 «Study of pathophysiological mechanisms of the formation of alcohol-related heart pathology and search for molecular targets for pharmacological correction of the revealed disorders».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Кравцова Оксана Юрьевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: oukravtsova@yahoo.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0693-2007
SPIN-код: 1733-2330
к. б. н., н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kravtsova Oxana Yu.
Corresponding author
e-mail: oukravtsova@yahoo.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0693-2007
SPIN code: 1733-2330
PhD of Biological sciences, researcher scientist of pharmacokinetics laboratory FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Колыванов Геннадий Борисович
e-mail: 7822535@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2571-0047
SPIN-код: 2538-8639
д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kolyvanov Gennadiy B.
e-mail: 7822535@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2571-0047
SPIN code: 2538-8639
Dr. Sci. in Biology, Leading researcher of the laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литвин Александр Алексеевич
e-mail: litbiopharm@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2818-3457
SPIN-код: 6193-5770
д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Litvin Alexander A.
e-mail: litbiopharm@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2818-3457
SPIN code: 6193-5770
Dr. Sci. in Biology, Leading researcher of the laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

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

Bochkov Pavel O.
e-mail: bok-of@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8555-5969
SPIN code: 5576-8174
PhD in Biology, Senior Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Жердев Владимир Павлович
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2710-7134
SPIN-код: 2213-9592
д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Zherdev Vladimir P.
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2710-7134
SPIN code: 2213-9592
Dr. Sci. in Medicine, professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики новых лекарственных средств, А.Н. Миронов (общ. Ред.), часть 1, Москва: Гриф и К, 2013. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskih issledovaniy lekarstvennyh sredstv. Ch.I. Moscow:Grif I K, 2013 (In Russ).].

2. Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. Скрининг кардиотропной активности в ряду α, ω-диарилметильных производных бис-(ωаминоалкил)аминов. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2016;(2):10–13. [Kryzhanovskii SA, Likhosherstov AM, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Mokrov GV, Gudasheva TA. Screening of the compounds having cardiotropic activity among the α, ω-diarilmetyl derivatives of bis-(ω-aminoalkyl) amines. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*. 2016;(2):10–13. (In Russ).].

3. Цорин И.Б., Барчуков В.В., Вититнова М.Б., Лихошерстов А.М., Мокров Г.В., Крыжановский С.А. Кардиопротекторные эффекты соединения АЛМ-802 на моделях субэндокардиальной ишемии. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2021;(1):18–22. [Tsorin IB, Barchukov VV, Vititnova MB, Likhosherstov AM, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA. Cardioprotective effects of compound ALM-802 on subendocardial ischemia models. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1):18–22 (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-1-18-22.

4. Барчуков В.В., Цорин И.Б., Лихошерстов А.М., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А., Крыжановский С.А. Противоишемическая активность триамина АЛМ-802 в условиях эндотелиальной дисфункции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;167(4):443–446. [Barchukov VV, Tsorin IB, Likhosherstov AM, Vititnova MB, Mokrov GV, Gudasheva TA, Kryzhanovskii SA. Anti-ischemic activity of triamine ALM-802 under conditions of endothelial dysfunction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019;167(4):443–446. (In Russ).].

5. Барчуков В.В., Цорин И.Б., Лихошерстов А.М., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Крыжановский С.А. Сравнительное изучение антиишемической активности триметазидина и соединения АЛМ-802 в условиях эндотелиальной дисфункции. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2019;(2):23–27. [Barchukov VV, Tsorin IB, Likhosherstov AM, Vititnova MB, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA. A comparative study of the anti-ischemic activity of trimetazidine and the compound ALM-802 under conditions of endothelial dysfunction. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*. 2019;(2):23–27. (In Russ).]. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10042.

6. Колыванов Г.Б., Бочков П.О., Литвин А.А., Шевченко Р.В., Подолько А.Л., Жердев В.П. Абсолютная биодоступность соединения, обладающего кардиопротективной активностью (АЛМ-802), у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(2):31–35. [Kolyvanov GB, Bochkov PO, Litvin AA, Shevchenko RV, Podolko AL, Zherdev VP. Absolute bioavailability of a substance with cardioprotective activity (ALM-802) in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(2):31–35. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-2-31-35.

7. Середенин С.Б., Мокров Г.В., Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Столярук В.Н. и др. Бис(метоксибензиламиноалкил)амины, обладающие кардиотропной активностью. Патент на изобретение RU 2624438, 04.07.2017. Заявка № 2014105635 от 17.02.2014. [Seredenin SB, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA, Likhosherstov AM, Stolyaruck VN et al. Bis(methoxybenzylaminoalkyl)aminy, obladayushie kardiotropnoy aktivnost`yu. Patent na izobretenie RU 2624438, 04.07.2017. Заявка № 2014105635 от 17.02.2014 (In Russ).].

Эффекты пантогама актив на поведение и нейрорецепторный спектр при моделировании синдрома дефицита внимания у мышей

Сухорукова Н. А., Васильева Е. В., Кондрахин Е. А., Салимов Р. М., Ковалёв Г. И.

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

Аннотация. Исследовано влияние субхронического введения пантогама актив (200 мг/кг, внутрибрюшинно) на поведение аутбредных мышей CD-1 в экспериментальной модели синдрома дефицита внимания на основе теста «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт» (ЗОКЛ). Пантогам актив корректировал исходный дефицит внимания у грызунов субпопуляции ED-low, не изменяя иные показатели их поведения в используемом тесте. При анализе результатов радиолигандного связывания установлены статистически значимые различия в распределении D_2- и ГАМК$_B$-рецепторов в структурах мозга субпопуляций аутбредных грызунов CD-1. В префронтальной коре (ПФК) контрольной группы животных ED-low со сниженным уровнем внимания в сравнении с контролем ED-high плотность D_2-рецепторов была выше на 18 %, тогда как плотность ГАМК$_B$-рецепторов ниже на 35 %. Введение пантогама актив приводило к снижению в ПФК грызунов ED-low плотности D_2-рецепторов на 23 % и увеличению данного показателя на 42 % для ГАМК$_B$-рецепторов, соответственно. Таким образом, изучаемый препарат обладает потенциальной эффективностью при дефиците внимания у экспериментальных животных, нормализует поведение и возможные молекулярные маркеры данной патологии.

Ключевые слова: синдром дефицита внимания; пантогам актив; закрытый обогащённый крестообразный лабиринт; радиолигандное связывание; D_2-рецептор; ГАМК$_B$-рецептор; NMDA-рецептор; исследовательское поведение; префронтальная кора

Для цитирования:
Сухорукова Н. А., Васильева Е. В., Кондрахин Е. А., Салимов Р. М., Ковалёв Г. И. Эффекты пантогама актив на поведение и нейрорецепторный спектр при моделировании синдрома дефицита внимания у мышей. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(2):23–30. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-23-30
Поступила: 02 июня 2022 г. **Принята:** 08 июня 2022 г. **Опубликована:** 30 июня 2022 г.

Effects of pantogam active on behavior and neuroreceptor spectrum in mouse model of attention deficit disorder

Sukhorukova NA, Vasil'eva EV, Kondrakhin EA, Salimov RM, Kovalev GI

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. Effect of Pantogam active subchronic administration (200 mg/kg/day, i.p.) on the behavior of outbred CD-1 mice in the experimental model of attention deficit disorder was studied in the "closed enriched cross maze" test. Pantogam active corrected the initial attention deficit of ED-low rodents subpopulation without changing other parameters of their behavior. Analysis of the results of radioligand binding revealed statistically significant differences in the distribution of D_2 and GABA$_B$-receptors in the brain structures of outbred CD-1 mice subpopulations. In the prefrontal cortex (PFC) of ED-low control group with reduced attention level, compared with ED-high control, density of D_2 receptors was higher by 18 %, while density of GABA$_B$ receptors was lower by 35 %. Administration of pantogam active resulted in decreasing of D_2 receptors density by 23 % and increasing of this indicator by 42 % for GABA$_B$- receptors in the PFC of ED-low animals, respectively. Thus, this studied drug has potential efficacy in treating attention deficit in experimental animals, normalizes behavior and possible molecular markers of this pathology.

Keywords: attention deficit disorder; pantogam active; closed enriched cross maze; radioligand binding; D_2 receptor; GABA$_B$-receptor; NMDA receptor; exploratory behavior; prefrontal cortex.

For citations:
Sukhorukova NA, Vasil'eva EV, Kondrakhin EA, Salimov RM, Kovalev GI. Effects of pantogam active on behavior and neuroreceptor spectrum in mouse model of attention deficit disorder. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(2):23–30. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-23-30
Received: June 02, 2022. **Accepted:** June 08, 2022. **Published:** June 30, 2022

Введение / Introduction

Ноотропные препараты получили широкое применение в отечественной клинической практике как при лечении различных неврологических заболеваний, так и сопутствующих симптомов при иных патологиях. Подобное обоснованное использование данной группы лекарственных средств связано с их адаптогенным и нейропротективным действием, способностью оптимизировать процессы метаболизма в нервной ткани в условиях стресса и гипоксии. Спектр фармакологической активности ноотропов включает в себя мнемотропное, антиастеническое, психостимулирующее и антидепрессивное действие. Благодаря малой токсичности, широкому диапазону дозирования и хорошей переносимости ноотропные препараты применимы у пациентов разных возрастных групп.

Положительное влияние ноотропов на когнитивные функции выражается в консолидации процессов запоминания, обучения, речи. При их приёме отмечается восстановление нарушенных корковых функций и регуляции активности субкортикальных структур мозга. Указанные клинические эффекты делают перспективным изучение механизмов действия и применения ноотропных препаратов при коррекции синдрома дефицита внимания (СДВ-Г). Проведённое ранее в Лаборатории радиоизотопных методов исследований изучение поведенческих эффектов ноотропных препаратов показало, что субхроническое введение фенибута, пирацетама и семакса нормализует исходный дефицит внимания у аутбредных мышей CD-1 [1–3]. Кроме того, с использованием методов радиолигандного связывания были получены данные о значимых отличиях в распределении подтипов дофаминовых и ГАМК-рецепторов в префронтальной коре мозга грызунов с различной устойчивостью внимания и о способности ноотропов нормализовать это распределение. В частности, известный препарат пантогам® (Са-соль D-гомопантотеновой кислоты), зарегистрированный в СССР в 1979 году [4], в дозе 100 мг/кг оказывает влияние на показатели поведения экспериментальных животных, сопоставимое с препаратом сравнения атомоксетином, рекомендуемым для фармакотерапии СДВ-Г [5, 6], сопровождающееся специфическими сдвигами D_2-дофаминовых и ГАМК$_В$-рецепторов мозга мышей [7]. В 2008 году на российский рынок вышел препарат пантогам актив®, являющийся рацемической модификацией пантогама (D,L-гомопантотенат кальция), ранее не описанный и не изученный фармакологически и нейрохимически. Выдвигалась гипотеза, что два стереоизомера смогут по-разному взаимодействовать с рецепторами, следовательно, оказывать различное фармакологическое действие [4].

Таким образом, *целью данной работы* стал анализ эффекта субхронического введения пантогама актив (200 мг/кг, внутрибрюшинно) на поведение аутбредных мышей CD-1 с различной устойчивостью внимания, а также его нейрорецепторное действие.

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 ($n = 66$), 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). Пантогам актив ((R,S)-4-[(2,4-Дигидрокси-3,3-диметил-бутирил)амино]бутират кальция (2:1)) был предоставлен ГК «ПИК-ФАРМА». При изучении рецепторного связывания использовали следующие лиганды: для ГАМК$_В$-рецепторов - [G-3H](-)баклофен с удельной активностью 49,7 Кюри/ммоль (Perkin Elmer, США), для D_2-подтипа дофаминовых рецепторов — [G-3H](-)сульпирид с удельной активностью более 40 Кюри/ммоль, синтезированные профессором, д. х. н. Ю.А. Золотарёвым в ОХФАВ ИМГ РАН (зав. отделом — академик РАН Н.Ф. Мясоедов). Остальные реактивы были приобретены в коммерческих источниках.

Поведенческие методы исследования (тест «Закрытый обогащённый крестообразный лабиринт»/ Behavioral research methods («Indoor enriched cruciform maze» test, Enrichment Discrimination test)

Грызунов подвергали поведенческому тестированию в закрытом обогащённом крестообразном лабиринте (ЗОКЛ) с помощью программы Enriset. Тест заканчивался, когда животное совершало 12 визитов в отсеки [8]. Критерием разделения животных на субпопуляции служили значения индекса распознавания новых объектов, определяющегося по формуле:

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

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-ratio>120) и **ED-low** (ED-ratio<100). После отбора грызунов обеих субпопуляций разделяли на контрольную и опытную подгруппы. Изучаемое вещество, растворённое в физрастворе, вводили внутрибрюшинно один раз в сутки (всего 6 инъекций), контрольной группе вводили физраствор в эквивалентном объёме. Выбор дозы 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 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 **PatrlN**, совершенных за время эксперимента, исчисляются числом заходов животного в отсеки лабиринта, совершенных 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.

Нейрохимические методы исследования (Радиолигандное связывание) / Neurochemical research methods (Radioligand binding assay)

После поведенческой сессии в закрытом обогащённом крестообразном лабиринте у мышей извлекали структуры головного мозга [9] и замораживали в жидком азоте для последующего радиолигандного анализа с дофаминовыми D_2-рецепторами, ГАМК$_В$- и NMDA-рецепторами.

Радиолигандный анализ D_2-рецепторов / Radioligand analysis of D_2-receptors

Для приготовления суспензии плазматических мембран префронтальной коры в экспериментах использовали метод, описанный в литературе [10]. Для радиолигандного анализа D_2-рецепторов использовали метод [11]. Процесс инкубации протекал в инкубационной смеси при температуре 25 °C в течение 1 часа при постоянном встряхивании. Инкубационная смесь состояла из инкубационного буфера, специфического радиоактивного лиганда D_2-подтипа дофаминового рецептора [G-^{3}H](-)сульпирида, немеченого сульпирида и мембран префронтальной коры. Порядок внесения компонентов был следующим: буфер, радиоактивный лиганд, нерадиоактивный лиганд. Мембраны вносили непосредственно перед началом инкубации.

Процесс связывания в инкубационной смеси останавливали путём добавления инкубационного буфера при температуре 4 °C с последующим быстрым фильтрованием через стекловолокнистые фильтры GF/B (Whatman). Общий объём инкубационного буфера для фильтрования одной пробы составлял 10 мл. Фильтры предварительно смачивали перед экспериментом в ледяном отмывочном буфере в течение 3 часов. После фильтрации пробы высушивали в течение 12 часов при комнатной температуре.

Радиолигандный анализ ГАМК$_В$-рецепторов / Radioligand analysis of GABA$_B$-receptors

Приготовление мембранных препаратов, содержащих ГАМК$_В$-рецепторы коры мышей, проводили по модифицированному методу [12, 13]. В день эксперимента мембраны размораживали при комнатной температуре и ресуспендировали в 20 объёмах буфера (50 мМ Tris-HCl, 2,5 мМ CaCl2, pH=7,4), затем центрифугировали при 8000 g 20 мин. Полученный осадок суспендировали в 20 объёмах буфера (50 мМ Tris-HCl, 2,5 мМ CaCl2, pH = 7,4) и центрифугировали при 20000 g 20 мин, последнюю процедуру повторяли ещё один раз. Конечный осадок ресуспендировали в свежем буфере. В экспериментах по радиолигандному анализу ГАМК$_В$-рецепторов использовали меченый тритием (-) баклофен с удельной активностью 49,7 Кюри/ммоль. Инкубационная смесь (конечный объём 0,5 мл) содержала 50 мкл [G-^{3}H](-)баклофена, 250 мкл буфера и 200 мкл суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченного лиганда ((-) баклофен, 1 mM). Реакционную смесь инкубировали при 4 °C в течение 20 мин. По окончании инкубации пробы фильтровали с использованием охлаждённого буфера через стекловолокнистые фильтры GF/C (Whatman), предварительно смоченные в 0,3 % полиэтиленимине в течение 2 часов при 4 °C. Общий объём буфера для фильтрования одной пробы составлял 8 мл. Фильтры просушивали при комнатной температуре.

Радиолигандный анализ NMDA -рецепторов / Radioligand analysis of NMDA-receptors

Выделение плазматических мембран префронтальной коры и гиппокампа для экспериментов по радиолигандному анализу NMDA-рецепторов проводили по модифицированным методам [14, 15]. После декапитации ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературном холодильнике при –75 °C. Префронтальную кору размельчали в гомогенизаторе Поттера «тефлон–стекло» в 10 объёмах буфера № 1 (5 mM HEPES, 4,5 mM Tris, 0,32 M Сахароза, pH 7,6). Гомогенат разбавляли 50 объёмами буфера № 2 (5 mM HEPES, 4,5 mM Tris, pH 7,6) и центрифугировали при 1000 g 10 мин на ультрацентрифуге «Optima L-70K» («Beckman Coulter»). Супернатант сливали и вновь центрифугировали при 25000 g 20 мин. Для увеличения выхода белка эту операцию проводили дважды. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объёмах буфера № 2 и центрифугировали при 8000 g 20 мин. Супернатант и верхний коричневый осадочный слой сливали и центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в 50 объёмах буфера № 3 (5 mM HEPES, 4,5 mM Tris, 1 mM Na_4EDTA, pH 7,6) и троекратно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 50 объёмах буфера № 2 и однократно центрифугировали при 25000 g 20 мин. Конечный осадок сохраняли в 5 объёмах буфера № 2 и замораживали в криопробирках в жидком азоте. В день анализа ткань размораживали, разбавляли в 10 объёмах буфера № 2, центрифугировали при 25000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера № 2. Концентрация белка в образцах мембран составляла 2–3 мг/мл. Для радиолигандного анализа NMDA рецепторов использовали меченный тритием МК-801(+), с удельной активностью 210 Кюри/ммоль. Реакционная смесь содержала 200 мкл буфера № 2, 50 мкл меченного лиганда (в диапазоне концентраций от 0,1 до 30 нМ) и 250 мкл белкового раствора. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 50 мкл немеченого лиганда (+)МК-801 (1 µМ), которое составляло 12–14 % от общего. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч.

Процесс связывания в инкубационной смеси останавливали путём добавления буфера № 2 при температуре 4 °С с последующим фильтрованием через стекловолокнистые фильтры GF/B (Whatman). Общий объём отмывочного буфера для фильтрования одной пробы составлял 10 мл. Фильтры предварительно смачивали перед экспериментом в охлаждённом отмывочном буфере в течение 3 часов. После фильтрации пробы высушивали в течение 12 часов при комнатной температуре. Затем фильтры заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола (4 г РРО и 0,2 г POPOP на 1 л толуола) и переносили во флаконы для сцинтилляционного счёта. Радиоактивность каждой пробы измеряли в течение 2 мин на сцинтилляционном счётчике Tri-Carb 2900TR (PerkinElmer).

Для анализа насыщения и получения характеристик связывания K_d и B_{max} измеряли специфическое связывание для D_2-рецепторов — от 1,25 до 40 нМ, для $ГАМК_B$- и NMDA -рецепторов — от 1,25 до 20 нМ. Специфическое связывание рассчитывали, как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Для построения кривых насыщения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 2 повторностях.

Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия / Liquid scintillation spectrometry

Предварительно просушенные фильтры GF/B и GF/C (Whatman) заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости (4 г РРО и 0,2 г POPOP на 1 л толуола) и переносили во флаконы для сцинтилляционного счёта. Радиоактивность проб определяли на счётчике Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer) с эффективностью счёта 42–46 %. Концентрацию белка измеряли по стандартной методике Лоури.

Определение концентрации белка методом Лоури / Lowry method of protein quantification

Концентрацию белка в образцах определяли по стандартной методике Лоури [16]. К аликвоте образца, содержащей белок (5—50µl объёмом), прибавляли 0,8 мл 0,1N р-ра NaOH. Смесь выдерживали при комнатной температуре не менее 12 часов или нагревали до 50–60 °С в течение 10 минут. Прибавляли 2 мл свежеприготовленного р-ра Лоури (к 250 мл 0,1 Н р-ра NaOH при помешивании добавляли 5 г карбоната натрия. После растворения отнимали 5мл. Навеску K^+,Na^+-тартрата в 60 мг растворяли в 3 мл дистиллированной воды. Навеску $CuSO_4$ в 30 мг растворяли в 3 мл дистиллированной воды. К раствору карбоната натрия в 0,1N NaOH добавляли по 2,5 мл растворов $CuSO_4$ и K^+, Na^+-тартрата, инкубировали 10 минут. Добавляли 0,2 мл 1Н реактива Фолина и немедленно встряхивали, инкубировали 30 минут. Измеряли адсорбцию при 750 нм.

Обработка и представление результатов / Statistical analysis

Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью программы Statistica 6.0. Различия между субпопуляциями мышей по изучаемым показателям оценивали по критерию Манна–Уитни. Полученные результаты представлены в виде средних значений с учётом стандартной ошибки среднего (mean±S.E.M). Для обработки результатов радиолигандного связывания использовали программу GraphPad Prism 7 Demo, результаты представлены в виде «mean±S.E.M».

Результаты / Results

В предложенной авторами трансляционной модели синдрома дефицита внимания при первичном поведенческом тестировании самцов аутбредных мышей CD-1 в исходной гетерогенной популяции были выделены подтипы грызунов с различной устойчивостью внимания к объектам в рукавах лабиринта. Субпопуляция **ED-low** (индекс ED-ratio<100) характеризовалась пониженной устойчивостью внимания в условиях теста ЗОКЛ, животные субпопуляции **ED-high** (индекс ED-ratio>120) были приняты в качестве нормы по данному показателю. В проведённых экспериментах как при первичном поведенческом тестировании, так и в завершающем тесте обе субпопуляции в контрольных группах не демонстрировали значимых отличий в иных показателях теста ЗОКЛ. При этом индекс ED-ratio у животных ED-low был снижен в 5,2 раза в сравнении с подтипом **ED-high** (табл. 1).

Субхроническое введение пантогама актив оказывало положительное корректирующее действие на исходный дефицит внимания, повышая индекс **ED-ratio** в опытной группе до 2,9 раз по сравнению с соответствующим контролем. У грызунов подтипа **ED-high** под воздействием препарата показатель внимания снижался в 1,9 раза относительно контрольной группы. Обнаруженное снижение нативного уровня внимания у данной субпопуляции сочеталось с изменением двигательной активности — общее время пребывания в боковых отсеках лабиринта **(T_GITm)** возрастало в 1,3 раза (см. табл. 1):

Таким образом, пантогам актив в выбранном режиме введения и дозе оказывает разнонаправленное действие на поведение грызунов CD-1 разных фенотипов преимущественно в отношении внимания как когнитивной функции. Вместе с тем, сопоставление его эф-

Таблица 1

Влияние субхронического введения пантогама актив (200 мг/кг, в/б) на показатели поведения субпопуляций мышей аутбредной линии CD-1 в тесте ЗОКЛ (m±S.E.M.)

Table 1

The effect of subchronical administration of pantogam-aktive (200 mg/kg/day, i.p.) on the behavior of subpopulations of outbred CD-1 mice in «closed enriched cross maze test» (m+S.E.M.)

Экспериментальная группа/ Показатель	Контроль ED-high (*n* = 19)	Пантогам актив ED-high (*n* = 19)	Контроль ED-low (*n* = 13)	Пантогам актив ED-low (*n* = 15)
Ноотропная активность				
F_PtrN	6,1±0,5	7,9±0,7	7,3±0,6	7,5±0,7
PatrlN	1,4±0,1	1,1 ±0,2	1,3±0,2	1,2±0,2
Тревожность				
F_ChTm	10,9±0,9	12,2±2,1	10±0,7	10,7±0,8
F_GlTm	8,9±1,3	11,6±1,9	12±4	11,1±1,4
Двигательная активность				
T_ChTm	51,6±4,3	65,7±10,1	61,2±5,3	55,7±6,6
T_GlTm	63,1±5,9	82,0±8,2#	65,4±4,3	55,7±4,7
Индекс различения объектов				
Obj_tR	384,2±44,5	197,6±46,7#	74,4±15,9*	216,8±35,9#

Примечания: * — статистически значимое отличие между субпопуляциями, F-критерий Фишера, $p < 0,05$; # — статистически значимое отличие между опытной и контрольными группами, F-критерий Фишера, $p < 0,05$.
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, $p < 0,05$.

фекта с действием пантогама (D-гомопантотената Ca^{2+}) обнаруживает следующие различия [7]: во-первых, пантогам в ежесуточной дозе 100 мг/кг избирательно изменяет сниженный индекс внимания **Obj_tR** лишь в субпопуляции **ED-low**, тогда как рацемат в дозе 200 мг/кг/день не только повышает в субпопуляции **ED-low**, но и снижает этот показатель в субпопуляции **ED-high**. Во-вторых, под воздействием пантогама актив возрастает и общее время обследования лабиринта (**T_ChTm + T_GITm**), что можно интерпретировать как проявление седации (см. Методы).

Данные экспериментов по радиолигандному связыванию *ex vivo* свидетельствуют о различном распределении изучаемых типов рецепторов в структурах мозга аутбредных грызунов CD-1 (табл. 2). В префронтальной коре (ПФК) контрольной группы животных **ED-low** со сниженным исходным уровнем внимания в сравнении с контролем **ED-high** плотность D_2-рецепторов оказывается выше на 18 %, тогда как плотность ГАМК$_B$-рецепторов, напротив, ниже на 35 %. Для NMDA-рецепторов данный параметр радиолигандного связывания не различается статистически достоверно как между контрольными, так и между опытными группами обеих субпопуляций.

Значимые различия в эффектах пантогама актив были обнаружены для дофаминовых и ГАМК$_B$-рецепторов и имеют избирательный характер (рис. 1). Так, под субхроническим воздействием препарата в ПФК животных ED-low уменьшается количество мест связывания для [G-^{3}H](-)сульпирида на 23 % и возрастает на 42 % для [G-^{3}H](-)баклофена (см. табл. 2). Любопытно отметить, что под влиянием аналогичного введения пантогама количество D_2-рецепторов в ПФК субпопуляции **ED-low** снижалось на 22 %, а плотность ГАМК$_B$-рецепторов увеличивалась на 43 % [7].

Следовательно, можно предположить, что в основе отличий наблюдаемых поведенческих и, возможно, клинических эффектов пантогама и пантогама актив лежат иные мишени – функциональные и/или молекулярные. Например, ранее нами было показано, что в рецепторном анализе *in vitro* D-гопантенат (пантогам) связывается с ГАМК$_A$-рецепторами коры мозга крыс с величиной IC_{50} = 63 + 7 мкМ, а рац-гопантенат — с IC_{50} = 37+5 мкМ ($p < 0,004$). С ГАМК$_B$-рецепторами первый взаимодействовал с IC_{50} = 10+1 мкМ, а второй с IC_{50} = 5,0+0,1 мкМ ($p < 0,004$). Следовательно, с учётом вдвое меньшего содержания D(R)-изомера в составе рац-пантогама участие ГАМК-рецепторов в эффектах обоих препаратов равносильно. Разница проявляется по отношению к D_2-рецепторам в стриатуме — первый с ними не взаимодействует, а второй связывается с IC_{50} = 229+16 мкМ ($p < 0,004$). На этом основании мы предположили, что особенности эффективности рацемической формы обусловлены присутствием в ней L(S)-изомера, который в 2–2,5 раза превосходит рецепторные эффекты рацемата [17]. Кроме того, в действии S- и R-энантиомеров на фермент пантотенаткиназу в митохондриях мышей

Таблица 2

Показатели радиолигандного связывания с рецепторами в структурах мозга субпопуляций мышей CD-1 при субхроническом введении пантогама актив (200 мг/кг, внутрибрюшинно) (m±S.E.M.)

Table 2

Parameters of radioligand binding with different types of receptors in brain structures of outbred CD-1 mice subpopulations after subchronical administration of pantogam-aktive (200 mg/kg/day, i.p.) (m+S.E.M.).

Радиолиганд	Структура мозга	Субпопуляции мышей CD-1							
		Контроль ED-high		Пантогам актив ED-high		Контроль ED-low		Пантогам актив ED-low	
		Параметры связывания							
		B_{max} (фмоль/мг белка)	K_d (нМ)	B_{max} (фмоль/мг белка)	K_d (нМ)	B_{max} (фмоль/мг белка)	K_d (нМ)	B_{max} (фмоль/мг белка)	K_d (нМ)
[G-^{3}H]-(+)MK-801	Префронтальная кора	1887±167	7,1±1,2	1972±44	8,6±1,4	1892±222	8,1±0,7	2653±163	8,5±0,9
	Гиппокамп	2598±153	8,2±1	2551±236	6,9±0,3	2676±131	7,7±1,6	2036±118	7,3±0,8
[G-^{3}H]-(-)сульпирид	Префронтальная кора	737±24	56±4,6	741±40	57,2±2,7	869±29*	61±2,9	671±18#	57,4±2,3
[G-^{3}H]-(-)баклофен	Префронтальная кора	148±4	24,8±0,9	144±4	25,9±1,1	96±2*	25,9±1,1	136±4#	25,4±1,2

Примечания: * — статистически значимое отличие между субпопуляциями, F-критерий Фишера, $p < 0,05$; # — статистически значимое отличие между опытной и контрольными группами, F-критерий Фишера, $p < 0,05$.
Notes: * — statistically significant difference between subpopulations, Fischer's F-test, $p < 0,05$; # — statistically significant difference between control and experimental groups, Fischer's F-test, $p < 0,05$.

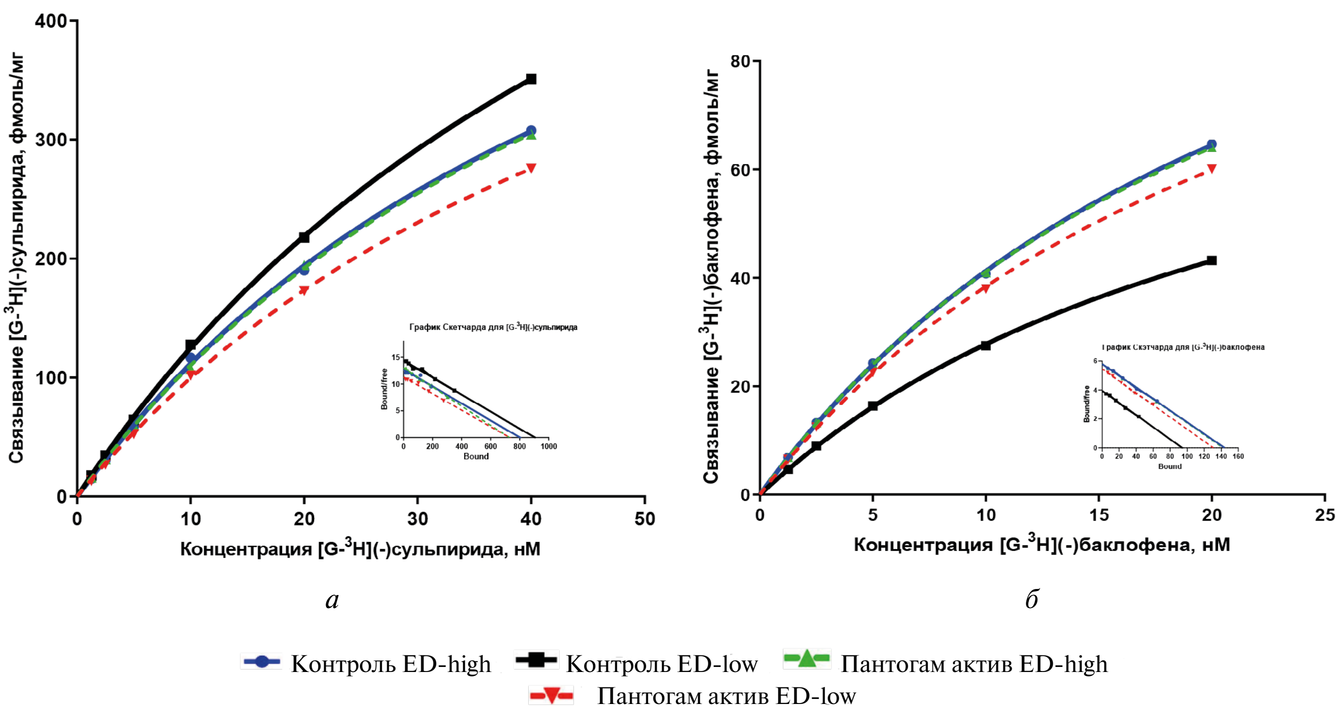


Рис. 1. Специфическое связывание [G-3H](-)сульпирида (*а*) и [G-3H](-)баклофена (*б*) мембранами ПФК мышей после субхронического введения пантогама актив (200 мг/кг/сутки, внутрибрюшинно).
Fig. 1. Specifical binding of G-3H](-)Sulpiride (*a*) and [G-3H](-)Baclofen (*б*) with prefrontal cortex membranes after subchronical administration of pantogam-aktive (200 mg/kg/day, i.p.).

первая форма оставалась неактивной, а второй демонстрировал конкурентный ингибирующий эффект с IC_{50} в интервале 50–150 мкМ, обнаруживая свойства антиметаболита пантотеновой кислоты [18].

Заключение / Conclusion

Таким образом, пантогам актив, являющийся рацематом D- и L-форм гомопантотеновой кислоты, при использовании фенотипической модели дефицита внимания нормализует этот показатель и его рецепторные маркеры (плотность дофаминовых D_2- и $ГАМК_B$-рецепторов префронтальной коры мозга). Однако, в отличие от эффекта пантогама (D-гомопантотената кальция), пантогам актив проявляет и качественные особенности — изменяет величину индекса внимания и увеличивает общее время изучения лабиринта в группе сравнения. Допускается, что это может быть связано с присутствием в составе пантогам актива L(S)-изомера, конкурирующего за D_2-рецепторы стриатума и в условиях *in vitro* [17].

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

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

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

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

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

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

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 metho FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Васильева Екатерина Валерьевна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9178-2823
SPIN-код: 1054-4872
с. н. с. лаборатории радиоизотопных методов исследований ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Vasileva Ekaterina V.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9178-2823
SPIN code: 1054-4872
Senior researcher, Laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Кондрахин Евгений Анатольевич
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7849-5267
SPIN-код: 3006-3485
с. н. с. лаборатории радиоизотопных методов исследований ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kondrakhin Evgenii A.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7849-5267
SPIN code: 3006-3485
Senior researcher, Laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

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

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

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

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. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В. и др. 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 et al. Analysis of behavioral and neuroreceptor effects of atomoxetine and phenibut in CD-1 subpopulations diverging in sustained attention. *Eksperimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiia*. 2021;84(4):3–11. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-4-3-11.

2. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А. и др. Влияние пирацетама 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 et al. Influence of piracetame on the brain receptor systems in CD-1 mice with different attention stability phenotype. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55(8):10–14 (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-10-14.

3. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А. и др., Субхроническое введение семакса повышает устойчивость внимания у мышей CD-1 через модуляцию D_2-дофаминовых рецепторов префронтальной коры мозга. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(6):3–10. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Kondrakhin EA et al., Subchronic administration of semax increases attention stability in CD-1 mice via modulation D_2-dopamine receptors in the prefrontal cortex. *Eksperimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiia*. 2021;84(6):3–10. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-6-3-10.

4. Пантогам и Пантогам актив. Клиническое применение и фундаментальные исследования / под ред. Копелевича В.М. М.: Триада-фарм; 2009 [Pantogam i Pantogam active. Klinicheskoe primenenie i fundamental'niye issledovaniya. Ed by Kopelevich VM. Moscow: Triada-farm; 2009. (In Russ).].

5. Таранушенко Т.Е., Кустова Т.В., Салмина А.Б. Синдром дефицита внимания и гиперактивности у детей. *Российский педиатрический журнал*. 2013;4:41–47 [Taranushenko TE, Kustova TV, Salmina AB. Syndrome of deficiency of attention and hyperactivity in children:(review). *Rossijskij pediatricheskij zhurnal*. 2013;4:41–47 (In Russ).].

6. Christman AK, Fermo JD, Markowitz JS. Atomoxetine, a novel treatment for attention-deficit–hyperactivity disorder. *Pharmacotherapy,* 2004;24(8):1020–1036. DOI: 10.1592/phco.24.11.1020.36146.

7. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В. и др. Влияние пантогама и атомоксетина на устойчивость внимания и распределение дофаминовых D_2 и ГАМК$_B$-рецепторов у мышей с моделью дефицита внимания. *Биомедицинская химия*. 2021; 67(5):402–410. [Kovalev GI, Sukhorukova NA,Vasil'eva EV et al. Influence of pantogam and atomoxetine on attention stability and distribution of dopamine D_2 and GABA$_B$ receptors in the attention deficit mouse model. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2021;67(5):402–410. (In Russ).]. DOI: 10.18097/PBMC20216705402.

8. Ковалев Г.И., Салимов Р.М., Сухорукова Н.А. и др. Нейрорецепторный профиль и поведение субпопуляций мышей CD-1, различающихся устойчивостью внимания. *Нейрохимия*. 2020;37(1):15–23. [Kovalev GI, Salimov RM, Sukhorukova NA et al. Neuroreceptor profile and behavior of CD-1 mice subpopulations with different attention stability. *Neurochemical Journal*. 2020;37(1):15–23. (In Russ).]. DOI: 10.1134/S1819712420010146.

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

10. Breese CR, Marks MJ, Logel J et al. Effect of smoking history on [^{3}H]nicotine binding in human postmortem brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;282(1):7–13.

11. Sun W. *In vivo* evidence for dopamine-mediated internalization of D_2-receptors after amphetamine: differential findings with [^{3}H]Raclopride versus [^{3}H]Spiperone. *Mol Pharmacol*. 2003;63(2):456–462. DOI: 10.1124/mol.63.2.456.

12. Bowery NG. [^{3}H](-)Baclofen: an improved ligand for GABAB sites. *Neuropharmacology*. 1985;24(3):207–210. DOI: 10.1016/0028-3908(85)90075-9.

13. Szekely AM, Barbaccia ML, Costa E. Effect of a protracted antidepressant treatment on signal transduction and [^{3}H](-)-baclofen binding at GABA$_B$ receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;243(1):155–159.

14. Zhou LM, Gu ZQ, Costa AM, et al. (2S,4R)-4-Methylglutamic Acid (SYM 2081)- a selective, high-affinity ligand for kainite receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280(1):422–427.

15. LePage KT, Ishmael JE, Low CM et al. Differintial binding properties of [G3H] dextorfan and [G-^{3}H]MK801 in heterologously expressed NMDA receptors. *Neuropharmacology*. 2005;49(1):1–16. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2005.01.029.

16. Waterborg JH, Matthews HR. The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*.1984;1:1–3. DOI: 10.1385/0-89603-062-8:1.

17. Ковалёв Г.И., Фирстова Ю.Ю., Абаимов Д.А. и др. Качественные и количественные особенности взаимодействия с рецепторами нейромедиаторов *in vitro*: пантогам и пантогам актив. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012;112(3): 44–48. [Kovalev GI, Firstova Yu Yu, Abaimov DA et al. Pantogam and pantogam active: qualitative and quantitative features of the interaction with neurotransmitter receptors *in vitro*. *Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. S.S.Korsakova*. 2012;112(3):44-48 (In Russ).].

18. Zhang Y-M, Chohnan Sh, Virga KG et al. Chemical knockout of pantothenate kinase reveals the metabolic and genetic programs responsible for hepatic coenzyme A homeostasis. *Cell Chemical Biology*. 2007;14(3): 291–302. DOI: 10.1016/j.chembiol.2007.01.013.

Влияние фабомотизола на микроциркуляцию крови в интактном и ишемизированном миокарде

Цорин И. Б., Симоненко С. А., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А.

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

Аннотация. Цель исследования – изучение влияния фабомотизола на микроциркуляцию крови в миокарде в условиях острой ишемии сердечной мышцы. Опыты проводили на наркотизированных (уретан, 1300 мг/кг в/б) белых беспородных крысах-самцах массой 220–250 г. Острую ишемию миокарда вызывали окклюзией левой коронарной артерии. Микроцикуляцию крови оценивали методом лазерной допплеровской флоуметрии с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАКК-ОП2». Установлено, что фабомотизол (15 мг/кг, в/в) в интактном сердце не влияет на микроциркуляцию крови. Сразу же после перевязки коронарной артерии в зоне ишемии миокарда микроциркуляция резко уменьшается (примерно на 30 %, p = 0,0106) и практически не меняется в условно-интактном миокарде. Фабомотизол, введённый за 5 мин до окклюзии коронарной артерии, предотвращал уменьшение микроциркуляции в зоне ишемии миокарда. Способность фабомотизола в условиях острой ишемии миокарда препятствовать снижению уровня микроциркуляции в ишемизированной зоне может вносить вклад в противоишемическую активность препарата.

Ключевые слова: острая ишемия миокарда; микроциркуляция крови; фабомотизол; крысы

Для цитирования:
Цорин И. Б., Симоненко С. А., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А. Влияние фабомотизола на микроциркуляцию крови в интактном и ишемизированном миокарде. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(2):31–35. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-31-35
Поступила: 02 июня 2022 г. **Принята:** 04 июня 2022 г. **Опубликована:** 30 июня 2022 г.

The effect of fabomotizole on blood microcirculation in intact and ischemic myocardium

Tsorin IB, Simonenko SA, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The investigation purpose was to study the effect of fabomotizole on blood microcirculation in intact and ischemic myocardium in conditions of acute ischemia of the heart muscle. The experiments were carried out on anesthetized (urethane, 1300 mg/kg, i.p.) white mongrel male rats weighing 220–250 g. Acute myocardial ischemia was caused by occlusion of the left coronary artery. Blood microcirculation was evaluated by laser Doppler flowmetry using a computerized laser analyzer "LAKK-OP2". It was found that fabomotizole (15 mg/kg, i.v.) in an intact heart does not affect blood microcirculation. Immediately after coronary artery ligation in the myocardial ischemia zone, microcirculation decreases sharply (by about 30 %, p = 0.0106) and practically does not change in the conditionally intact myocardium. Fabomotizole, administered 5 minutes before occlusion of the coronary artery, prevented a decrease in microcirculation in the ischemic zone of the myocardium. The ability of fabomotizole in conditions of acute myocardial ischemia to prevent a decrease in the level of microcirculation in the ischemic zone may contribute to the anti-ischemic activity of the drug.

Keywords: acute myocardial ischemia; blood microcirculation; fabomotizole; rats

For citations:
Tsorin IB, Simonenko SA, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA. The effect of fabomotizole on blood microcirculation in intact and ischemic myocardium. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(2):31–35. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-31-35
Received: June 02, 2022. **Accepted:** June 04, 2022. **Published:** June 30, 2022.

Введение / Introduction

Сосудистая система сердца состоит из трёх компонентов, которые имеют различные функции. Большие эпикардиальные коронарные артерии имеют ёмкостную функцию. Преартериолы представляют собой промежуточный компонент. Их специфическая функция заключается в поддержании давления в начале следующего компонента в ответ на изменения коронарного перфузионного давления и/или потока. Дистальный микрососудистый компонент состоит из артериол и капилляров. Артериолы являются местом метаболической регуляции миокардиального кровотока, поскольку их тонус паракринно и/или аутокринно регулируется биологически активными агентами (оксид азота, аденозин и др.), вырабатываемыми в процессе метаболизма миокарда [1, 2]. Специфической функцией капилляров является согласование/обеспечение потребностей кардиомиоцитов в кислороде и энергетических субстратах. От состояния микрососудистого кровотока в большой степени зависит устойчивость миокарда к ишемии, а микрососудистая дисфункция, сопутствующая острому инфаркту миокарда, во многом обуславливает долгосрочный негативный прогноз заболевания [3]. Особенно это касается уровня микроциркуляции крови в периинфарктной зоне миокарда, который в условиях острой ишемии миокарда, собственно, и обуславливает размер зоны некротического поражения. Вместе с тем, следует отметить, что особенности состояния микроциркуляторного русла миокарда как в физиологических условиях, так и на фоне патологии до настоящего времени остаются мало изученными [4, 5]. То же касается возможности/эффективности использования фармакологических агентов для оптимизации микроцируляции в ишемизированном миокарде.

В ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» под руководством академика РАН *Середенина С. Б.* создан и фармакологически изучен оригинальный анксиолитик фабомотизол (афобазол), который помимо собственно анксиолитической активности обладает цитопротекторным, в частности кардиопротективным, действием [6]. В экспериментах, выполненных на различных моделях, воспроизводящих как острую, так и хроническую ишемию миокарда, показано, что фабомотизол проявляет выраженную антиишемическую активностью [7–9]. Однако механизмы, за счёт которых фабомотизол оказывает антиишемическое действие, остаются до конца не ясными, в частности не известно как препарат влияет на кровоснабжение ишемизированного миокарда.

Цель исследования. Изучить влияние фабомотизола на микроциркуляцию крови в интактном и ишемизированном миокарде в условиях острой ишемии сердечной мышцы.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 220–250 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агенства», филиал «Столбовая». Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологи имени В.В. Закусова» при контролируемом освещении (12 ч – свет/12 ч – темнота) и постоянной температуре (+21 – +23 °C) со свободным доступом к воде и брикетированному корму в течение 10 суток до начала тестирования. Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Переиздание). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, установленными международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Экспериментальный протокол. Эксперименты проводили на наркотизированных животных (уретан 1300 мг/кг, в/б) в условиях открытой грудной клетки и искусственного дыхания, проводимого с помощью аппарата искусственной вентиляции лёгких для мелких лабораторных животных (Ugo Basile, Италия). Животные находились на подогреваемом лабораторном столике (t = 38 °C), Surgi Suite, Kent Scintific Corparation, США. Температуру в лабораторной комнате поддерживали в пределах 24–25 °C.

Крыс рандомизировали на 3 группы: 1-я – интактные животные, получавшие фабомотизол (n = 6); 2-я – контрольные крысы с острой ишемией миокарда (n = 6); 3-я – животные с острой ишемией миокарда, получавшие фабомотизол (n = 6).

Острую ишемию миокарда вызывали с помощью окклюзии левой коронарной артерии на 2–3 мм ниже её выхода из-под ушка левого предсердия.

Фабомотизол вводили в/в в дозе 15 мг/кг в изотоническом растворе натрия хлорида за 5 мин до окклюзии коронарной артерии.

Метод измерения микроциркуляции крови. Оценку уровня микроциркуляции в миокарде проводили методом лазерной допплеровской флоуметрии с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАКК-ОП2» (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 3.0.2.395. Световодные зонды перед началом эксперимента размещали на поверхности левого желудочка сердца в потенциально условно-интактной и ишемизированной зонах. Микроциркуляцию крови регистрировали непрерывно на протяжении всего эксперимента. Микрокровоток оценивали в перфузионных единицах (перф. ед.) [10, 11].

Препараты. Фабомотизола дигидрохлорид (субстанция, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»), уретан (субстанция, «Acros organics», Индия), изотонический раствор натрия хлорида (ООО «Мосфарм», Россия).

Статистический анализ. Нормальность распределения данных проверяли по критерию Шапиро–Уилка. Так как результаты измерений микроциркуляции крови были распределены по нормальному закону, то для определения значимости различий использовали дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Дункану. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$.

Результаты /Results

Анализ данных показал, что у крыс с интактным сердцем фабомотизол (15 мг/кг, в/в) не влияет на микроциркуляцию крови в миокарде (табл. 1). Так, если исходный показатель микроциркуляции был равен 27,30±1,79 перф. ед., то через 20 и 30 мин после окончания в/в введения препарата её уровень составил 27,52±0,68 и 27,40±0,51 перф. ед., соответственно. Иная картина наблюдалась в условиях острой ишемии миокарда (табл. 2). У контрольных животных в условно-интактной зоне миокарда уровень микроциркуляции крови после окклюзии коронарной артерии первые 20 мин наблюдения не менялся, а к 30-й минуте увеличивался на 15 %, что, по всей видимости, носит компенсаторный характер. В ишемизированном миокарде уровень микроциркуляции сразу же после

Таблица 1

Влияние фабомотизола (15 мг/кг, в/в) на микроциркуляцию крови (перф. ед.) в миокарде интактных наркотизированных крыс ($n = 6$)

Table 1

Effect of fabomotizole (15 mg/kg, i.v.) on blood microcirculation (perf. units) in the myocardium of intact anesthetized rats ($n = 6$)

Исходный уровень / The initial level	10 мин после введения / 10 min after administration	20 мин после введения / 20 min after administration	30 мин после введения / 30 min after administration
27,30±1,79	26,60±0,63 $p = 0,60$	27,52±0,68 $p = 0,88$	27,40±0,51 $p = 0,94$

Примечания: 1. Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; 2. p – указано по отношению к исходному уровню.
Notes: 1. Arithmetic means and their standard errors are shown; 2. p – is indicated relative to the initial level.

Таблица 2

Влияние фабомотизола (15 мг/кг, в/в) на микроциркуляцию крови (перф. ед.) в миокарде наркотизированных крыс в условиях острой ишемии сердечной мышцы

Table 2

The effect of fabomotizole (15 mg/kg, i.v.) on blood microcirculation (perf. units) in the myocardium of anesthetized rats under conditions of acute ischemia of the heart muscle

Группа / Group	Зона / Zone	Исходный уровень / The initial level	Время после окклюзии коронарной артерии, мин / The time after the coronary artery occlusion, min		
			10	20	30
Контроль, $n = 6$ / Control, $n = 6$	Условно-интактная / The conditionally intact zone	20,50±0,72	21,22±0,91 $p = 0,44$	20,30±1,18 $p = 0,83$	23,28±0,98 $p = 0,0073$
	Ишемизированная / The ischemic zone	21,90±0,98	14,18±1,22 $p < 0,0001$	14,78±1,35 $p < 0,0001$	14,80±1,44 $p < 0,0001$
Фабомотизол, $n = 6$ / Fabomotizole, $n = 6$	Условно-интактная / The conditionally intact zone	19,83±0,72 $p_1 = 0,65$	17,96±0,91 $p = 0,0652$ $p_1 = 0,0437$	17,24±1,18 $p = 0,0143$ $p_1 = 0,0542$	18,83±0,98 $p = 0,29$ $p_1 = 0,0073$
	Ишемизированная / The ischemic zone	20,25±0,98 $p_1 = 0,41$	21,20±1,22 $p = 0,45$ $p_1 = 0,0015$	21,31±1,35 $p = 0,44$ $p_1 = 0,0029$	19,77±1,44 $p = 0,70$ $p_1 = 0,0106$

Примечания: 1. Указаны средние арифметические и их стандартные ошибки; 2. p – ошибка I рода по отношению к исходному уровню; 3. p_1 – ошибка I рода по отношению к контролю.
Notes: 1. Arithmetic means and their standard errors are indicated; 2. p – type I error in relation to the initial level; 3. p_1 – type I error in relation to the control.

перевязи коронарной артерии резко снижался (более чем на 30 %). Так, если исходный уровень равнялся 21,90±0,98 перф. ед., то через 10 мин после окклюзии коронарной артерии он снижался до 14,18±1,22 перф. ед. ($p < 0,0001$) и оставался на этом уровне в течение всего эксперимента (табл. 2). Фабомотизол, введённый за 5 мин до окклюзии коронарной артерии, в первые 20 мин ишемии вызывал снижение уровня микроциркуляции (≈ на 10 %) в условно-интактной зоне миокарда (см. табл. 2), что, возможно, связано со способностью препарата перераспределять кровоток в пользу ишемизированного участка миокарда. Это предположение подтверждают результаты измерения микроциркуляции в зоне ишемии, где кровоток на протяжении 30 мин окклюзии коронарной артерии не изменялся по сравнению с исходным уровнем и был статистически значимо больше по сравнению с контролем (табл. 2). Так, если на 30-й минуте ишемии в контроле кровоток в зоне ишемии составлял 14,80±1,44 перф. ед., то у животных, получавших фабомотизол, этот показатель был равен 19,77±1,44 перф. ед. ($p = 0,0106$).

Заключение / Conclusion

Как следует из вышеизложенного, фабомотизол в условиях острой ишемии миокарда препятствует снижению микроциркуляции крови в зоне ишемии, что в отсроченной перспективе может реализоваться в уменьшении зоны некроза. Это теоретическое предположение подтверждают результаты ранее проведённых экспериментов, согласно которым систематическая экспериментальная терапия фабоматизолом крыс с острым инфарктом миокарда способствует статистически значимому уменьшению зоны некротического поражения [7, 12]. Механизмы, лежащие в основе этого эффекта фабомотизола, требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, как следует из полученных данных, фабомотизол не влияет на уровень микроциркуляции крови у животных с интактным миокардом, однако в условиях острой ишемии миокарда способствует его поддержанию в зоне ишемии.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

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

Tsorin Iosif B.
e-mail: tsorin@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-3988-7724
SPIN code: 4015-3025
Dr. Sci. Biological, Leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Симоненко София Алексеевна
e-mail: irvik98@gmail.com
лаборант-исследователь лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Simonenko Sophia A.
e-mail: irvik98@gmail.com
Laboratory assistant of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Вититнова Марина Борисовна
e-mail: MB-Vit@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7407-7516
SPIN-код: 1901-8919
к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Vititnova Marina B.
e-mail: MB-Vit@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7407-7516
SPIN code: 1901-8919
PhD Biological Sci., Senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Крыжановский Сергей Александрович
Автор, ответственный за переписку
e-mail: SAK-538@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2832-4739
SPIN-код: 6596-4865
д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kryzhanovskiy Sergey A.
Corresponding author
e-mail: SAK-538@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2832-4739
SPIN code: 6596-4865
Dr. Sci. (Med.), Head of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Camici PG, Olivotto I, Rimoldi OE. The coronary circulation and blood flow in left ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(4):857–864. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.08.028.

2. Del Buono MG, Montone RA, Camilli M, Carbone S, Narula J, Lavie CJ, Niccoli G, Crea F. Coronary microvascular dysfunction across the spectrum of cardiovascular diseases: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2021;78(13):1352–1371. DOI: 10.1016/j.jacc.2021.07.042

3. Armstrong R, De Maria GL, Scarsini R, Banning AP. Assessing and managing coronary microcirculation dysfunction in acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2019;17(2):111–126. DOI: 10.1080/14779072.2019.1561279.

4. Xia R, Zhu T, Zhang Y, He B, Wang L, Zheng J, Gao F. Microcirculation of intramyocardial hemorrhage caused by reperfused myocardial infarctions with ultrasmall superparamagnetic iron oxide cardiac magnetic resonance imaging. *Acta Radiol.* 2021;Oct 20: 2841851211046332. DOI: 10.1177/02841851211046332.

5. Gori T. Coronary venous therapy to improve microvascular dysfunction. Clin Hemorheo. Microcirc. 2021;79(1):103–107. DOI: 10.3233/CH-219103.

6. Крыжановский С.А, Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Середенин С.Б. Плейотропные (кардиотропные) эффекты анксиолитика афобазола. *Терапевт.* 2012;(1):32–40. [Kryzhanovskii SA, Stolyaruck VN, Vititnova MB, Tsorin IB, Seredenin SB. Pleiotropic (cardiotropic) effects of the anxiolytic afobazole. *Therapist.* 2012;(1):32–40. (In Russ).].

7. Крыжановский С.А., Сорокина А.В., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мирошкина И.А., Цорин И.Б., Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Изучение антиишемического действия «Афобазола» в условиях экспериментального инфаркта миокарда. *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 2010;150(9):284–287. [Kryzhanovskii SA, Sorokina AV, Stolyaruck VN, Vititnova MB, Miroshkina IA, Tsorin IB, Durnev AD, Seredenin SB. Study of anti-ischemic effect of afobazole in experimental myocardial infarction. *Bull Experim Biol Med.* 2010;150(9):284–287. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-011-1131-4.

8. Цорин И.Б., Барчуков В.В., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А., Середенин С.Б. Изучение противоишемической активности фабомотизола гидрохлорида в условиях эндотелиальной дисфункции. *Бюлл. эксперим биол и мед.* 2019;167(5):573–576. [Tsorin IB, Barchukov VV, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA, Seredenin SB. Anti-ischemic activity of fabomotizole hydrochloride under conditions of endothelial dysfunction. *Bull Experim Biol Med.* 2019;167(5):573–576. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-019-04586-x.

9. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Ионова Е.О., Барчуков В.В., Кожевникова Л.М., Середенин С.Б. Из-

учение кардиопротективных эффектов фабомотизола гидрохлорида на трансляционной модели хронической сердечной недостаточности. *Бюлл эксп биологии и медицины*. 2019;168(7):39–44. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Ionova EO, Barchukov VV, Kozhevnikova LM, Seredenin SB. Studying the cardioprotective effects of fabomotizol hydrochloride on a translation model of chronic heart failure. *Bull Exp Biol Med*. 2019;168(1):33–37. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-019-04639-15.

10. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем, Колебания, информация, нелинейность. М.: Книжный дом «Либроком»; 2014. 498 с. [Krupatkin AI, Sidorov VV. Functional diagnostics of the state of microcirculatory-tissue systems, Vibrations, information, nonlinearity. Moscow: Book house «Librocom»; 2014. (In Russ).].

11. Сидоров В.В., Рыбаков Ю.Л., Гукасов В.М. Диагностический подход для оценки состояния микроциркуляторно-тканевой системы с использованием лазерных технологий и температурной функциональной пробы. *Иноватика и экспертиза*. 2018;22(1):135–142. [Sidorov VV, Rybakov YuL, Gukasov VM. Diagnostic approach for estimation of the state of microcirculator-tissue system using laser technologies and temperature functional sample. *Innovation and expertise*. 2018;22(1):135–142. (In Russ).].

12. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Сорокина А.В. Вититнова М.Б., Столярук В.Н., Мирошкина И.А., Чичканов Г.Г., Середенин С.Б. Кардиопротективные эффекты афобазола у животных с хронической ишемией миокарда. *Молекулярная медицина*. 2013;(5):37–42. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Sorokina AV, Vititnova MB, Stolyaruk VN, Miroshkina IA, Chichkanov GG, Seredenin SB. Cardioprotective effects of afobazol in animals with chronic myocardial ischemia. *Molecular Medicine*. 2013;(5):37–42. (In Russ).].

Разработка и валидация методики количественного определения порфиринов методом ВЭЖХ-УФ в моче

Кильдюшкин Д. А.[1], Петухов А. Е.[1], Литвин Е. А.[2]

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

[2] – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Аннотация. Порфирии — это группа орфанных патологических нарушений в пути биосинтеза гема, которые тяжело поддаются диагностике. В настоящее время не существует универсального метода анализа данной группы заболеваний. Система обращённо-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектором может быть использована для определения различных порфиринов в моче пациентов. Идентификация синтезируемых в организме порфиринов была проведена на системе Waters Acquity UPLC H-CLASS с диодно-матричным детектором. С помощью разработанного метода были определены единовременно 9 маркёров в 8 точках нарушения биосинтеза гема и внутренний стандарт. Разработанный метод обращённо-фазовой ВЭЖХ может быть использован при диагностировании порфирий.

Ключевые слова: порфирии; высокоэффективная жидкостная хроматография; УФ-детектор; порфирины; гем

Для цитирования:
Кильдюшкин Д. А., Петухов А. Е., Литвин Е. А. Разработка и валидация методики количественного определения порфиринов методом ВЭЖХ-УФ в моче. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(2):36–45. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-36-45
Поступила: 02 июня 2022 г. **Принята:** 08 июня 2022 г. **Опубликована:** 30 июня 2022 г.

Development and validation of a method for porphyrins quantification using HPLC-UV in urine

Kildyushkin DA[1], Petukhov AE[1], Litvin EA[2]

[1] – 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

[2] – Federal State Budgetary Institution «Federal research center of pediatric hematology, oncology and immunology named after Dmitry Rogachev» of the Ministry of Heath of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. Porphyrias are the group of orphan diseases, related to pathological disruptions of heme biosynthesis. These diseases are hard to diagnose timely and existing methods lack universality. High performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detector could be adapted for this purpose via determination of porphyrins in human urine. Waters Acquity UPLC H-CLASS with diode matrix was used in this study. Developed method allows determining the inner standard and 9 biomarkers, each connected to specific stage of heme biosynthesis. Developed method is validated for porphyrias diagnosis.

Keywords: porphyrias; high performance liquid chromatography; UV-determination; porphyrins; heme

For citations:
Kildyushkin DA, Petukhov AE, Litvin EA. Development and validation of a method for porphyrins quantification using HPLC-UV in urine. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(2):36–45. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-36-45
Received: June 02, 2022. **Accepted:** June 08, 2022. **Published:** June 30, 2022.

Введение / Introduction

Порфирии — это заболевания, которые отнесены к группе орфанных, которые к тому же обладают сложностями при диагностировании. Также у этих заболеваний низкая специфичность клинических проявлений и латентность протекания патологии. Поэтому для успешной терапии пациентов необходима своевременная диагностика. К различным типам порфирий приводят нарушения, связанные с ферментами, регулирующими превращения одних порфиринов в другие и участвующими в пути биосинтеза гема.

Данные заболевания считаются редкими во всём мире, к примеру, в США от различных типов страдает менее 200 000 человек, в Швеции распространённость одного из типов порфирий (острая перемежающаяся порфирия) насчитывает 1/75 000 жителей [1, 2]. В России же, как сказано выше, данное заболевание причислено к группе орфанных с числом заболевших 10/100 000 человек, по заключению Национального гематологического сообщества [3].

Порфирины — природные и синтетические тетрапиррольные соединения, формально — производные порфина, предшественники гема, лишённые железа. Это — малорастворимые в воде вещества, проявляющие кислотные свойства. Эти соединения имеют хромофорные группы и сопряжённые электронные системы, которые дают окрашивание в видимом спектре от розового до коричневого, интенсивно флуоресцируют в диапазоне 600–730 нм [4, 5].

Существуют различные методы обнаружения порфиринов, обладающие своими недостатками и преимуществами.

Ферментные тесты имеют высокую чувствительность и селективность, требуют небольших объёмов исследуемого материала. Применяются при диагностике острой перемежающейся порфирии для анализа порфобилиногендеаминазы эритроцитов. Но для выявления порфирий используются редко, так как маркёры этой группы заболеваний зачастую нестабильны [6]. Данные тесты трудны в воспроизведении и требовательны к специфическим типам тканей, такими как культивируемые фибробласты, лимфоциты или биопсийный материал печени.

Генетические тесты — это одни из самых точных методов на сегодняшний день, но чаще они являются уточняющими методами диагностики, так как требуют предварительного сбора анамнеза у родственников, биохимических тестов, к тому же занимают много времени для их проведения [7] и требуют специфического оборудования.

Характерные физико-химические свойства порфиринов открывают возможность анализировать их при помощи методов ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) и ГЖХ (газо-жидкостная хроматография). Хроматография — аналитический метод, используемый для разделения многокомпонентных смесей. Он основан на распределении веществ между неподвижной фазой (сорбентом) и подвижной (жидкость, элюент) и на различном сродстве компонентов пробы к этим фазам. Сам процесс распределения веществ (их взаимодействие с НФ) зависит от таких качеств вещества, как их размерность, полярность или способность к связыванию [8].

Метод ГЖХ обладает хорошей чувствительностью и селективностью, а именно способностью при изменениях свойств жидкой фазы разделять очень близкие по свойствам вещества. Но применим данный метод только к газообразным и термостабильным веществам. Для других соединений требуется предварительная дериватизация, что увеличивает время и этапы пробоподготовки [9].

При нормально-фазовой хроматографии стационарная фаза полярная (силикагель со свободными силанольными группами), подвижная фаза должна быть неполярная (гептан, уксусный эфир и др.). У обращённо-фазовой хроматографии полярность фаз противоположна: стационарная фаза — неполярная (поверхность силикагеля покрыта гидрофобными функциональными группами), а подвижная фаза — полярная (вода; полярные органические растворители, такие как ацетонитрил и метанол). Обращённо-фазовые системы применяются чаще, так как используемые растворители (вода, метанол, ацетонитрил) прозрачны для УФ-волн, что позволяет проводить исследования в широком УФ-диапозоне.

Порфирины и их производные обладают интенсивной полосой поглощения на границе между ультрафиолетом и видимой областью (около 400 нм): полоса Соре [10, 11], что открывает возможность использовать диодную матрицу — доступный и недорогой детектор. Стационарность оптической системы способна уловить сигналы от порфиринов и обеспечить высокую точность измерения во всем спектральном диапазоне.

При использовании системы ВЭЖХ для определения порфиринов не требуется наличия узкопрофильных специалистов или дорогостоящего оборудования. С учётом вышесказанного на данный момент ВЭЖХ является самой распространённой методикой для диагностики порфирий.

В настоящем исследовании применён метод обращённо-фазной ВЭЖХ с УФ-детектированием. Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта, чтобы учесть внутрисерийную индивидуальную вариацию сигналов, добавляемого к образцам в определённой концентрации.

С помощью разработанного метода были определены единовременно 9 маркёров в 8 точках нарушения биосинтеза гема, сам гем и внутренний стандарт.

Материалы и методы / Materials and methods

Реагенты / Reagents

Стандарты порфиринов, включающие уропорфирин I, уропорфирин III, гептакарбоксилпорфирин I, гексакарбоксилпорфирин I, пентакарбоксилпорфирин I, копропорфирин I, копропорфирин III, мезопорфирин IX и протопорфирин IX, были приобретены в Thermo Fisher Scientific, США. 2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX, используемый в качестве внутреннего стандарта, также был получен от Thermo Fisher Scientific, США.

Метанол квалификации «для ВЭЖХ» приобретён у Thermo Fisher Scientific, США. Соляная кислота, уксусная кислота и аммония ацетат приобретены у Sigma-Aldrich, США. Вода деионизованная получена в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ.

Оборудование / Equipment

Хроматограф Waters Acquity UPLC H-CLASS со следующими модулями: диодно-матричным детектором ACQ-PDA eλ, термостатом ACQ-CM, автосэмплером ACQ-FTN и насосным блоком ACQ-QSM.

Неподвижная фаза: колонка Phenomenex Luna® C18(2) 250*4.6 мм, зернением 5 мкм и с предколонкой-фильтром Waters 0,2 мкм.

Подвижная фаза: двухкомпонентный градиент:

А – 1М раствор аммония ацетата в воде, доведённый до pH 5,16 при помощи уксусной кислоты;

В – 100 % метанол.

Подвижная фаза подавалась градиентом со скоростью потока, равной 0,9 мл/мин (здесь и далее указан процент фазы В): 0 мин — 20 %; 2 мин — 20 %; 25 мин — 100 %; 30 мин — 100 %; 31 мин — 20 %; 33 мин — 100 %; 35 мин — 100 %; 36 мин — 20 %; 41 мин — 20 %.

Термостат. Температура колонки в процессе анализа была комнатной: 25±2 °С.

Детектор. Диодная матрица с монохроматором, выставленным на 400±1,2 нм.

Объём вкола: 10 мкл.

Анализ хроматограмм проводили при помощи программного обеспечения Empower 3.0, калибровочные кривые были построены в Origin 7.0.

Приготовление калибровочных растворов / Preparation of calibration solutions

Растворы индивидуальных порфиринов были приготовлены из стандартных стоковых растворов, содержащих 2 мкМ соответствующих порфиринов, в диапазонах концентраций: 0; 32,25; 67,5; 125; 250; 500 и 1000 нМ, разведённых в 2М соляной кислоте и донорской моче.

Пробоподготовка / Sample preparation

К 500 мкл калибровочных растворов прибавляли 500 мкл 2М соляной кислоты и 50 мкл внутреннего стандарта. Пробоподготовку проводили в непрозрачных эппендорфах, защищённых от света. Полученную смесь помещали на вортекс (10 мин), после чего центрифугировали 10 мин при 14000 g. Надосадочную жидкость отбирали и вводили в хроматограф.

Калибровка / Calibration

Калибровочные кривые строили по семи точкам для каждого из исследуемых соединений. Калибровочные кривые были построены методом наименьших квадратов линейной регрессией.

Образцы / Samples

Для данной методики использовался биологический материал – моча от доноров-добровольцев, давших своё согласие.

Валидация / Validation

Валидация оценивается по следующим основным параметрам:

- правильность;
- прецизионность;
- предел обнаружения;
- нижний предел количественного определения;
- эффект матрицы;
- линейность;
- селективность.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Валидация / Validation

Селективность / Selectivity

Как видно на хроматограммах стандартов порфиринов на рис. 1 и 2, свободные порфирины выходят в течение 30 мин. Хроматограммы показывают, что эндогенные соединения в моче не оказывают влияния на определение порфиринов и ВС, что и предопределяет высокую селективность.

Разработанный метод позволяет разделить изомеры не только уропорфирина (уропорфирин I и уропорфирин III), но и копропорфирина (копропорфирина I и копропорфирин III), что показано на рис. 3–6 в разных концентрациях. Времена удержания (RT, мин) подписаны на самих рисунках.

По строению эти изомеры очень близки: они различаются лишь в 17 и 18 радикалах у уропорфиринов (остаток пропионовой и уксусной кислот) [11, 12] и копропорфиринов (CH_3- и остаток пропионовой кислоты) [13]. Для разработанного метода фактор разделения (α) для уропорфиринов составляет 1,03, а для копропорфиринов — 1,04. Разрешение составляет 2,76 и 6,66, соответственно.

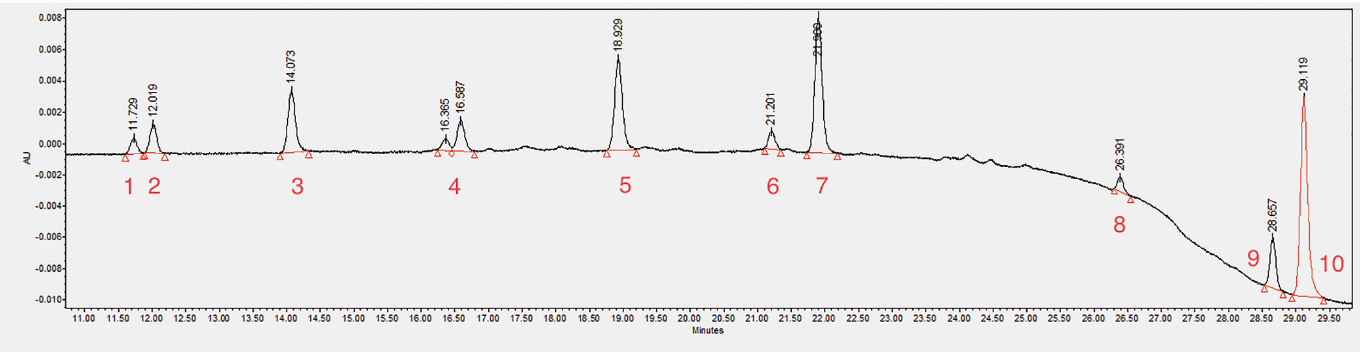


Рис. 1. Хроматограмма стандартов порфиринов в моче при индивидуальных концентрациях 500 нМ
Fig. 1. Chromatogram of mix of 500 nM porphyrin standards in intact donor urine

Примечания: Времена удержания (мин) подписаны над пиками. 1 — уропорфирин I; 2 — уропорфирин III; 3 — гептакарбоксилпорфирин I; 4 — гексакарбоксилпорфирин I; 5 — пентакарбоксилпорфирин I; 6 — копропорфирин I; 7 — копропорфирин III; 8 — внутренний стандарт (2-винил-4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX); 9 — мезопорфирин IX; 10 — протопорфирин IX.

Notes: Retention times (min) are marked above each peak. 1 — Uroporphyrin I, 2 — Uroporphyrin III, 3 — Heptacarboxylporphyrin I, 4 — Hexacarboxylporphyrin I, 5 — Pentacarboxylporphyrin I, 6 — Coproporphyrin I, 7 — Coproporphyrin III, 8 — internal standard, 9 — Mesoporphyrin IX, 10 — Protoporphyrin IX.

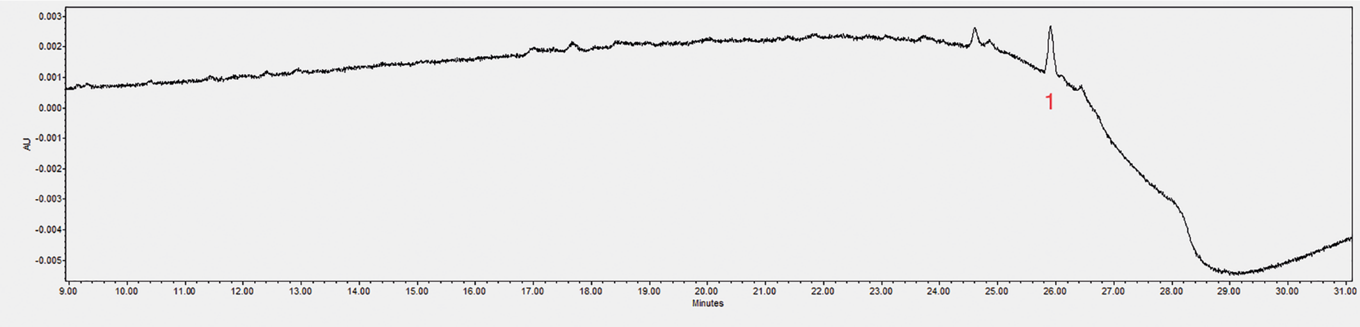


Рис. 2. Хроматограмма донорской мочи с добавлением внутреннего стандарта (1) в концентрации 95 нМ
Fig. 2. Chromatogram of donor urine with 95 nM internal standard (marked as 1)

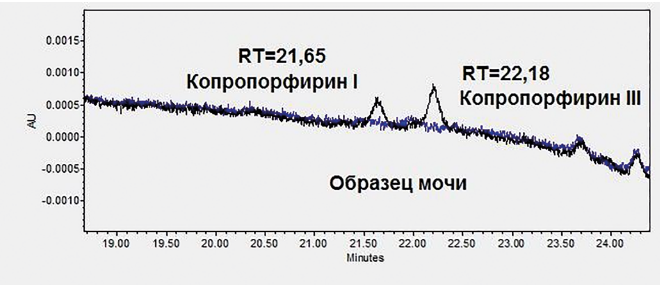


Рис. 3. Хроматограмма стандартов копропорфиринов I и III в концентрации 62,5 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (синий)
Fig. 3. Chromatogram of coproporphyrin I and III standards at 62,5 nM compared with intact human urine (blue)

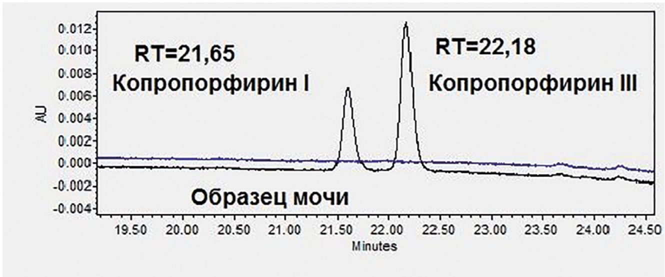


Рис. 4. Хроматограмма стандартов копропорфиринов I и III в концентрации 500 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (синий)
Fig. 4. Chromatogram of coproporphyrin I and III standards at 500 nM compared with intact human urine (blue)

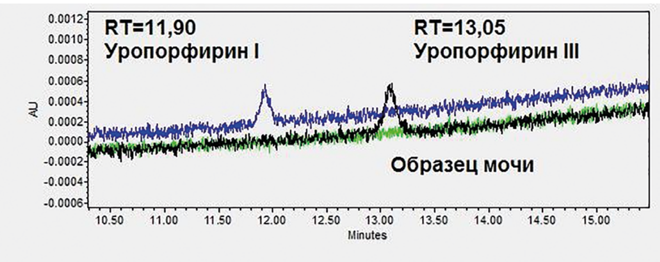


Рис. 5. Хроматограмма стандартов уропорфиринов I и III в концентрации 62,5 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (зелёный)
Fig. 5. Chromatogram of uroporphyrin I and III standards at 62,5 nM compared with intact human urine (green)

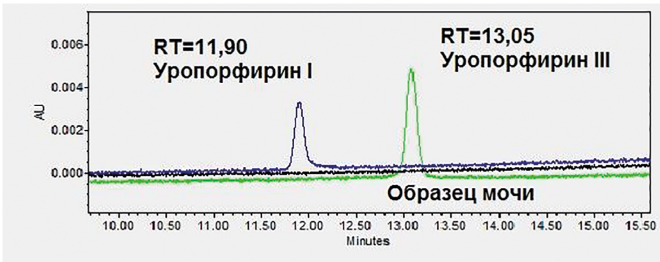


Рис. 6. Хроматограмма стандартов уропорфиринов I и III в концентрации 500 нМ в сравнении с интактной донорской мочой (чёрный)
Fig. 6. Chromatogram of uroporphyrin I and III standards at 500 nM compared with intact human urine (black)

Линейность / Linearity

При определении линейности был проведён анализ 9 донорских образцов с прибавлением стандартных растворов уропорфирина I, уропорфирина III, гептакарбоксилпорфирина I, гексакарбоксилпорфирина I, пентакарбоксилпорфирина I, копропорфирина I, копропорфирина III, мезопорфирина IX и протопорфирина IX до получения концентраций: 0; 32,25; 62,5; 125; 250; 500 и 1000 нМ. По полученным значениям построены калибровочные кривые. Данные представлены на рис. 7. Выявлена линейная зависимость между отношением площадей пиков порфиринов и ВС от концентраций.

Прецизионность и правильность / Precision and accuracy

Оценка прецизионности и правильности методики была проведена на основании анализа 9 стандартов в 5 различных концентрациях: 62,5; 125; 250; 500 и 1000 нМ. Измерения проводили в шести повторах. После измерений были посчитаны следующие статистические параметры:

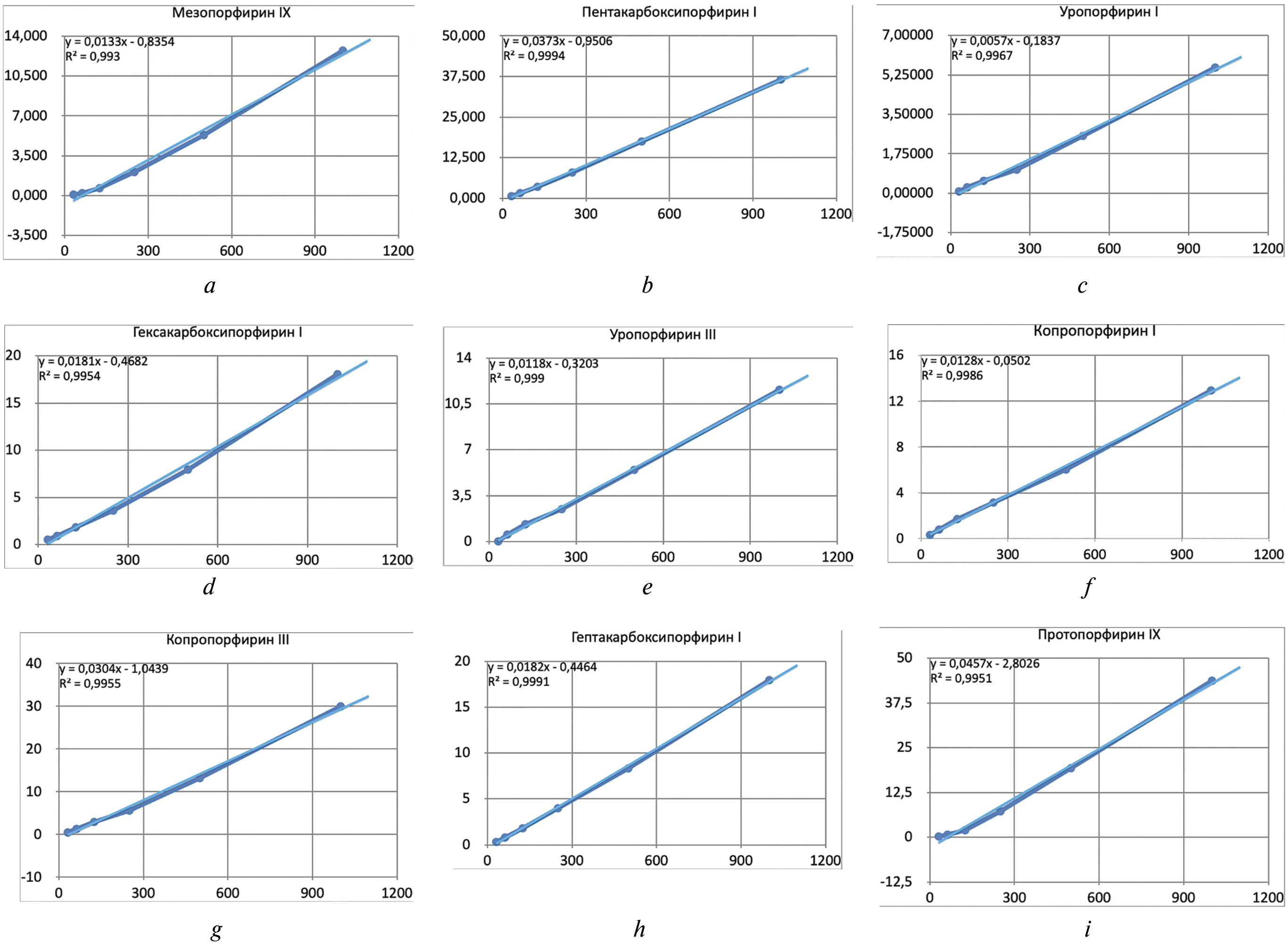


Рис. 7. Калибровочные кривые порфиринов (*a* — *i*)
Fig. 7. Calibration curves for individual porphyrins (*a* — *i*)

Примечания: По оси Y — отношения площадей пиков стандартов порфиринов к площади внутреннего стандарта. По оси X — концентрации порфиринов от 0 до 1000 нМ. На графиках указаны уравнения для линии тренда (голубая) и значения R^2; *a* — мезопорфирин IX; *b* — пентакарбоксипорфирин I; *c* — уропорфирин I; *d* — гексакарбоксипорфирин I; *e* — уропорфирин III; *f* — копропорфирин I; *g* — копропорфирин III; *h* — гептакарбоксипорфирин I; *i* — протопорфирин IX.

Notes: Y axis is rato of porphyrin standard peak area to IS peak area. X axis is porphyrin concentrations from 0 to 1000 nM. Trend lines (light blue), their equations and R^2 values are indicated on each graphics; *a* — mesoporphyrin IX; *b* — pentacarboxyporphyrin I; *c* — uroporphyrin I; *d* — hexacarboxyporphyrin I; *e* — uroporphyrin III; *f* — coproporphyrin I; *g* — coproporphyrin III; *h* — heptacarboxyporphyrin I; *i* — protoporphyrin IX.

1. Среднее значение ($\overline{x}$, нМ);
2. Стандартное отклонение (SD, нМ);
3. Коэффициент вариации (CV, %);
4. Стандартная ошибка среднего (SE, нМ);
5. Предел относительной погрешности (ε, %).

Результаты анализа представлены в табл. 1–9.

Нижний предел количественного определения / Lower limit of quantitation

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли, исходя из представленных данных о линейности, правильности и прецизионности. НПКО данных стандартов был выбран на уровне 62,5 нМ, чтобы позволило определять их в парах и с высокой точностью. На рис. 8 и 9 представлены хроматограммы гептакарбоксипорфирина I и пентакарбоксипорфирина I на уровне НПКО в сравнении с фоном — донорской мочой (красные графики). Времена удержания (RT, мин) подписаны на самих рисунках.

Эффект матрицы / Matrix effect

С целью изучения влияние матричного эффекта сравнивали образцы мочи с водными растворами (с добавлением HCl 2 нМ) порфиринов. Матричный фактор (MF) определён как частное среднего значения площадей хроматографического пика в образцах мочи и среднего значения площадей хроматографических пиков в водных образцах сравнения. CV для MF составил меньше 15 %. Из этого следует вывод, что разбросы в значениях при анализе проб удовлетворительны, а сам матричный эффект стабильный.

Таблица 1

Показатели прецизионности и правильности мезопорфирина IX

Table 1

Precision and accuracy parameters for mesoporphyrin IX

Истинные концентрации, нМ	Статистические параметры				
X	$\bar{x}$	SD	CV	SE	ε
1 000	1 007,84	37,49	3,72	15,30	0,78
500	503,15	41,72	8,29	17,03	0,63
250	251,28	26,29	10,46	10,73	0,51
125	114,64	22,21	19,37	9,07	–8,29
62,5	62,78	3,70	5,89	1,51	0,45

Таблица 2

Показатели прецизионности и правильности пентакарбоксипорфирина I

Table 2

Precision and accuracy parameters for pentacarboxyporphyrin I

Истинные концентрации, нМ	Статистические параметры				
X	$\bar{x}$	SD	CV	SE	ε
1 000	1 004,11	37,07	3,69	15,14	0,41
500	506,99	27,04	5,33	11,04	1,40
250	247,03	34,17	13,83	13,95	–1,19
125	126,32	19,58	15,50	7,99	1,05
62,5	62,56	5,85	9,35	2,39	0,10

Таблица 3

Показатели прецизионности и правильности копропорфирина I

Table 3

Precision and accuracy parameters for coproporphyrin I

Истинные концентрации, нМ	Статистические параметры				
X	$\bar{x}$	SD	CV	SE	ε
1 000	1 040,05	59,52	5,72	24,30	4,01
500	484,15	32,76	6,77	13,37	–3,17
250	232,68	27,66	11,89	11,29	–6,93
125	139,81	34,86	24,93	14,23	11,85
62,5	61,40	9,93	16,18	4,05	–1,76

Таблица 4

Показатели прецизионности и правильности протопорфирина IX

Table 4

Precision and accuracy parameters for protoporphyrin IX

Истинные концентрации, нМ	Статистические параметры				
X	$\bar{x}$	SD	CV	SE	ε
1 000	1 003,21	24,23	2,42	9,89	0,32
500	496,25	15,01	3,02	6,13	–0,75
250	241,39	19,74	8,18	8,06	–3,44
125	112,33	14,78	13,15	6,03	–10,14
62,5	60,03	8,51	14,17	3,47	–3,95

Таблица 5

Показатели прецизионности и правильности уропорфирина I

Table 5

Precision and accuracy parameters for uroporphyrin I

Истинные концентрации, нМ	Статистические параметры				
X	$\bar{x}$	SD	CV	SE	ε
1 000	1 018,50	35,88	3,52	14,65	1,85
500	498,85	41,71	8,36	17,03	–0,23
250	244,20	25,23	10,33	10,30	–2,32
125	123,30	14,18	11,50	5,79	–1,36
62,5	60,87	15,21	24,98	6,21	–2,61

Таблица 6

Показатели прецизионности и правильности гексакарбоксипорфирина I

Table 6

Precision and accuracy parameters for hexacarboxyporphyrin I

Истинные концентрации, нМ	Статистические параметры				
X	$\bar{x}$	SD	CV	SE	ε
1 000	1 014,80	22,77	2,24	9,30	1,48
500	461,38	34,69	7,52	14,16	–7,72
250	245,19	23,93	9,76	9,77	–1,93
125	125,67	12,51	9,95	5,11	0,53
62,5	70,37	10,12	14,39	4,13	12,59

Таблица 7

Показатели прецизионности и правильности гептакарбоксипорфирина I

Table 7

Precision and accuracy parameters for heptacarboxyporphyrin I

Истинные концентрации, нМ	Статистические параметры				
X	$\bar{x}$	SD	CV	SE	ε
1 000	973,07	53,09	5,46	21,67	–2,69
500	485,92	32,59	6,71	13,30	–2,82
250	241,77	16,75	6,93	6,84	–3,29
125	128,72	17,42	13,53	7,11	2,97
62,5	69,52	12,66	18,21	5,17	11,23

Таблица 8

Показатели прецизионности и правильности уропорфирина III

Table 8

Precision and accuracy parameters for uroporphyrin III

Истинные концентрации, нМ	Статистические параметры				
X	$\bar{x}$	SD	CV	SE	ε
1 000	1 039,34	50,33	4,84	20,55	3,93
500	500,86	20,08	4,01	8,20	0,17
250	232,97	22,38	9,61	9,14	–6,81
125	120,76	13,04	10,80	5,32	–3,39
62,5	59,03	11,01	18,65	4,49	–5,55

Таблица 9

Показатели прецизионности и правильности копропорфирина III

Table 9

Precision and accuracy parameters for coproporphyrin III

Истинные концентрации, нМ	Статистические параметры				
X	$\bar{x}$	SD	CV	SE	ε
1 000	1 008,60	49,09	4,87	20,04	0,86
500	536,11	114,70	21,40	46,83	7,22
250	240,89	27,75	11,52	11,33	–3,64
125	117,76	10,27	8,72	4,19	–5,80
62,5	63,28	10,64	16,82	4,35	1,24

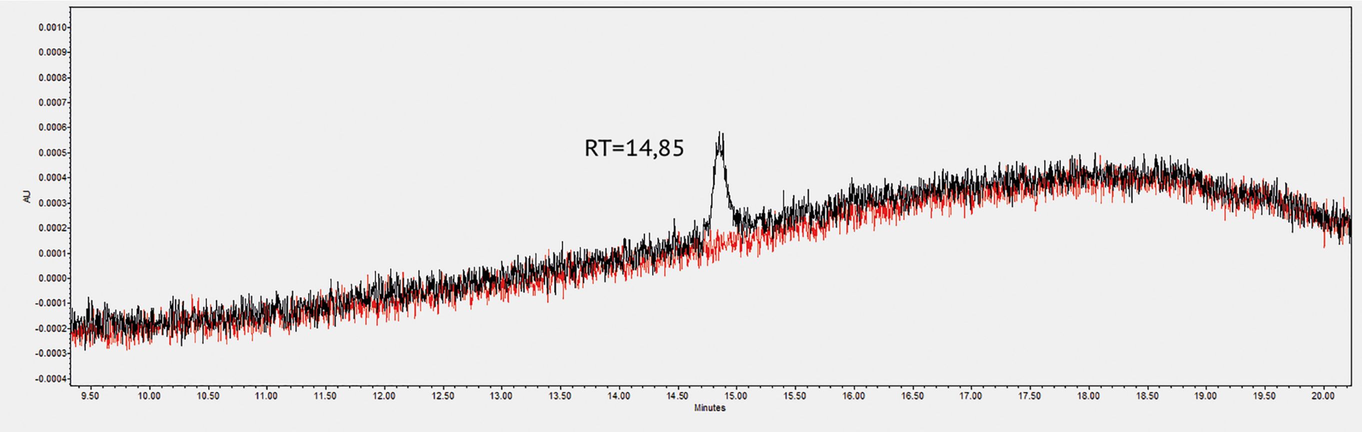


Рис. 8. Хроматограмма стандарта гептакарбоксипорфирина I в концентрации 62,5 нМ
Fig. 8. Chromatogram of 62,5 nM heptacarboxyporphyrin I standard compared to intact urine (red)

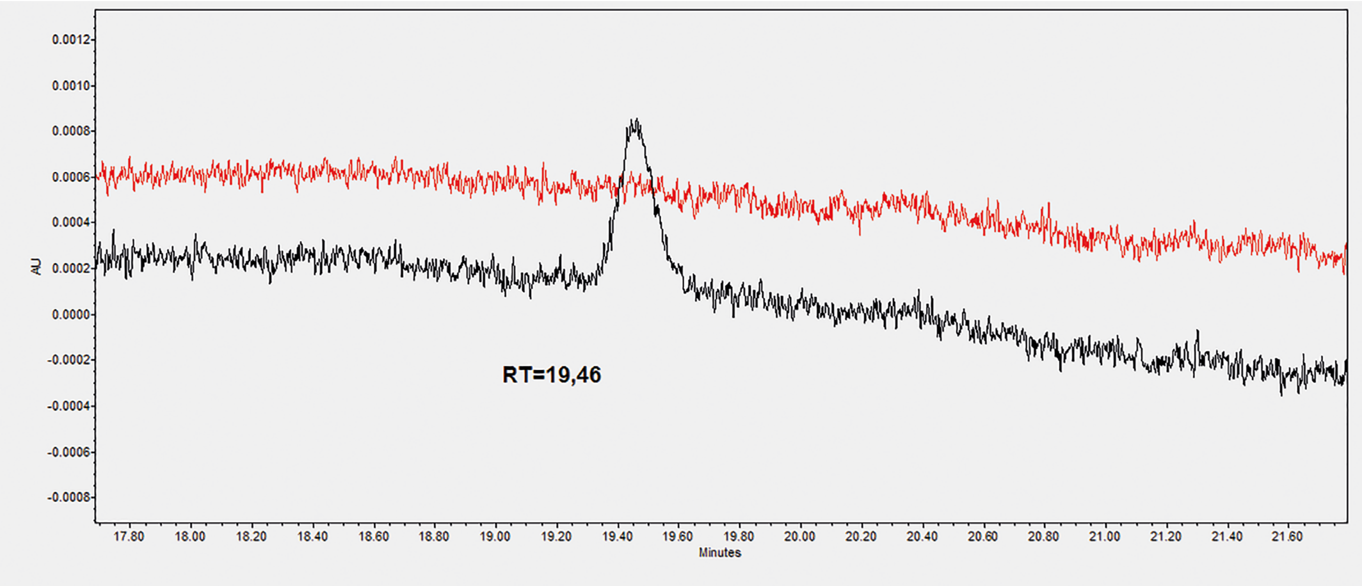


Рис. 9. Хроматограмма стандарта пентакарбоксипорфирина I в концентрации 62,5 нМ
Fig. 9. Chromatogram of 62,5 nM pentacarboxyporphyrin I standard compared to intact urine (red)

Предел обнаружения / Limit of detection

Наименьшая концентрация порфиринов, которую данная методика позволяет надёжно отделить от фонового шума [14] при анализе образцов мочи, равняется 31,25 нМ. На рис. 10 представлен пример гептакарбоксипорфирина I в сравнении с фоном — донорской мочой (синий график). Время удержания (RT, мин) подписано на самом рисунке.

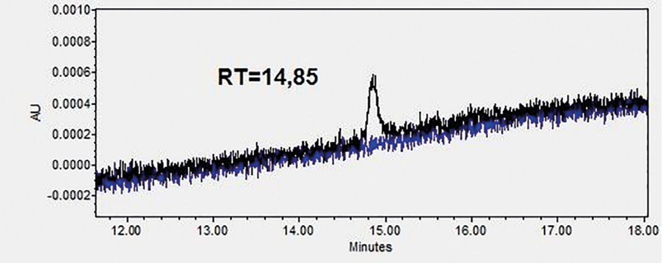


Рис. 10. Хроматограмма стандарта гептакарбоксипорфирина I в концентрации 31,25 нМ
Fig. 10. Chromatogram of 31,25 nM heptacarboxyporphyrin I standard compared to intact urine (blue)

Заключение / Conclusion

Адаптированная методика количественного определения различных типов прорфиринов методом ВЭЖХ с УФ-детектированием является надёжной, свободной от помех, а также подходит для специфического количественного определения порфиринов в моче человека. Во время валидации данной методики были установлены:

1. Значения НПКО и предела обнаружения.
2. Соответствие требованиям по селективности, точности, прецизионности и линейности проходит по требованиям руководств по валидации аналитических методик ICH, EMA, Британской фармакопеи и USP 31 издания, а также ОФС ГФ XIV издания [15–21].

Конфликт интересов. Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

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

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Кильдюшкин Даниил Андреевич
Автор, ответственный за переписку
e-mail: kildan@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8807-2145
Аспирант структурного отделения: кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Kildyushkin Daniil A.
Corresponding author
e-mail: kildan@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8807-2145
Postgraduate at the Department of Pharmaceutical and Toxicological chemistry A. P. Arzamascev, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow, Russia

Петухов Алексей Евгеньевич
e-mail: a-l-e-x4@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4855-4235
к. ф. н., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Petukhov Alexey E.
e-mail: a-l-e-x4@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4855-4235
PhD Pharm Sci., Associate Professor at the Department of Pharmaceutical and Toxicological chemistry A. P. Arzamascev, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Seche-novskiy University), Moscow, Russia

Литвин Евгений Александрович
e-mail: evgeny.litvin@fccho-moscow.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-6331-5339
к. б. н., н. с. лаборатории фундаментальной и прикладной фармакологии ФГБУ «ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва, России

Litvin Evgeny A.
e-mail: evgeny.litvin@fccho-moscow.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-6331-5339
PhD Biological Sci., Scientific at Laboratory of applied and fundamental pharmacology, D. Rogachev FRCPHOI, Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Badminton MN, Elder GH. Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(3):277–286. DOI: 10.1007/s10545-005-8050-3.

2. Nordmann Y, Puy H. Human hereditary hepatic porphyrias. *Clin Chim Acta.* 2002 Nov;325(1-2):17–37. DOI: 10.1016/s0009-8981(02)00276-0.

3. Витковская И.П., Законодательные основы организации оказания медицинской помощи пациентам с орфанными заболеваниями в Москве. ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ»; Апрель 25, 2017; Москва. [Vitkovskaya IP, Zakonodatel'nye osnovy organizatsii okazaniya meditsinskoĭ pomoshchi patsientam s orfannymi zabolevaniyami v Moskve. GBU «NIIOZMM DZM»; 2017 apr 25; Moskva (In Russ).]. Доступно по: https://docplayer.com/amp/72312944-Zakonodatelnye-osnovy-organizacii-okazaniya-medicinskoy-pomoshchi-pacientam-s-orfannymi-zabolevaniyami-v-moskve.html. Ссылка активна на 12.04.2022.

4. Quiroz-Segoviano RI, Serratos IN, Rojas-González F, et al. On tuning the fluorescence emission of porphyrin free bases bonded to the pore walls of organo-modified silica. *Molecules.* 2014 Feb 21;19(2):2261–2285. DOI: 10.3390/molecules19022261.

5. Macours P, Cotton F. Improvement in HPLC separation of porphyrin isomers and application to biochemical diagnosis of porphyrias. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(12):1433–1440. DOI: 10.1515/CCLM.2006.266.

6. Hindmarsh JT. Enzyme assays and the porphyrias: which tissues and when indicated. *Clin Dermatol.* 1998 Mar-Apr;16(2):245–250. DOI: 10.1016/s0738-081x(97)00204-6.

7. Crossley BM, Bai J, Glaser A, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Invest.* 2020 Nov;32(6):767–775. DOI: 10.1177/1040638720905833.

8. McMurry J. Organic chemistry: with biological application. 2nd ed. Belmont, (CA): Brooks/Cole. pp. 395; 2011.

9. Тыжигирова В.В. Газовая хроматография. Краткая характеристика метода и его применение в фармацевтическом анализе: учебное пособие. [Tyzhigirova VV. Gazovaya khromatografiya. Kratkaya kharakteristika metoda i ego primenenie v farmatsevticheskom analize: uchebnoe posobie. (In Russ).]. URL: https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/0c969d9c_gazovaya_hromatografiya_2016.pdf. Ссылка активна на 15.04.22.

10. Huang W, Liu Q, Zhu EY, Shindi AA, Li YQ. Rapid simultaneous determination of protoporphyrin IX, uroporphyrin III and coproporphyrin III in human whole blood by non-linear variable-angle synchronous fluorescence technique coupled with partial least squares. *Talanta.* 2010 Sep 15;82(4):1516–1520. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.07.034.

11. Fortian A, Castaño D, Gonzalez E, et al. Structural, thermodynamic, and mechanistical studies in uroporphyrinogen III synthase: molecular basis of congenital erythropoietic porphyria. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2011;83:43–74. DOI: 10.1016/B978-0-12-381262-9.00002-1.

12. Walke A, Molina ES, Stummer W, König S. Protoporphyrin IX Analysis from Blood and Serum in the Context of Neurosurgery of Glioblastoma. In: Mitulović G, editor. Mass Spectrometry in Life Sciences and Clinical Laboratory [Internet]. London: IntechOpen; 2020 [cited 2022 April 15]. Available from: https://www.intechopen.com/chapters/74409. DOI: 10.5772/intechopen.95042.

13. Danton M, Lim CK. Porphyrin profiles in blood, urine and faeces by HPLC/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 2006 Jun-Jul;20(6-7):612–621. DOI: 10.1002/bmc.656.

14. Guidelines for the validation and verification of chemical test methods. Published by the National Association of Testing Authorities, Australia (NATA) [cited 2022 April 16]. Available from: https://catalogo.latu.org.uy/opac_css/doc_num.php?explnum_id=1169.

15. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Topic Q2 (R1) «Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology». — ICH, Geneva. (1995).

16. FDA Guidance Documents. «Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics». FDA. (Jul., 2015).

17. ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд., М.: МЗ РФ, 2018, Т.1-4. 7019 с. [OFS.1.1.0012.15 Validatsiya analiticheskikh metodik. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiiskoi Federatsii. XIV izd., M.: MZ RF, 2018, T.1-4. 7019 s. (In Russ).]. Доступно по: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskih-metodik/?amp. Ссылка активна на 16.04.2022.

18. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Утв. Решением коллегии стран ЕЭК от 17.07.2018 № 113. 2018. 26 с. [Rukovodstvo po validatsii analiticheskikh metodik provedeniya ispytanii lekarstvennykh sredstv. Utv. Resheniem kollegii stran EEK ot 17.07.2018 № 113. 2018. 26 s. (In Russ).]. URL: https://www.alta.ru/tamdoc/18kr0113/. Ссылка активна на 16.04.2022.

19. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007, 49 с. [Rukovodstvo po validatsii metodik analiza lekarstvennykh sredstv. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya i sotsial'nogo razvitiya RF, 2007, 49 s. (In Russ).]. URL: http://www.fptl.ru/biblioteka/validaciya-metodik/rukovodsto-po-validacii-analiticheskih-metodik_2007.pdf. Ссылка активна на 17.04.2022.

20. Pharmacopeia (USP-31) General Chapters: <1225> Validation of compendial methods.

21. ICH Q2B, International Conference on Harmonisation, Validation of analytical procedures. Methodology, (2002).

Разработка подходов для исследования биораспределения бицистронной терапевтической плазмидной конструкции в организме мыши

Джауари С. С.[1], *Карагяур М. Н.*[1,2], *Балабаньян В. Ю.*[1,2], *Скрябина М. Н.*[1], *Примак А. Л.*[1], *Стамбольский Д. В.*[3]

[1] – *Факультет фундаментальной медицины, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*

[2] – *Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*

[3] – *Медицинский научно-образовательный центр, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*

Аннотация. *Актуальность*. Применение генотерапевтических препаратов для лечения генетических заболеваний и стимуляции процессов регенерации является длительным и подразумевает осуществление повторных инъекций, что может привести к усилению диссеминации генотерапевтических конструкций из области введения и нежелательной эктопической экспрессии закодированных в них ростовых факторов. Существующие подходы по изучению фармакокинетики лекарственного препарата для оценки диссеминации генотерапевтического препарата из очага введения неприменимы. *Цель*: оценить пригодность метода ПЦР в реальном времени для изучения биораспределения перспективного генотерапевтического препарата в организме мыши при курсовом применении. *Методы*. Самцам мышей F1 CBA×C57/Black делали инъекции исследуемой плазмиды в денервированную большеберцовую мышцу после травмы нерва, а также через 4, 9 и 13 дней в дозировке 60 и 120 мкг/мышь. Через 7, 14 и 28 дней после окончания курса инъекций образцы органов и тканей изымали, тотальную ДНК выделяли, и содержание плазмидной ДНК оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. *Результаты*. Было показано, что изученная генетическая конструкция способна диссеминировать из области введения. Было установлено, что пик диссеминации для данной конструкции в органах и тканях мыши достигается через 14–28 суток после окончания курсового применения, при этом эктопической экспрессии факторов роста в них не наблюдается. *Заключение*. Предложенный метод является специфичным, высокочувствительным и линеен в широком диапазоне концентраций. Таким образом, он может быть рекомендован для изучения биораспределения потенциальных генотерапевтических препаратов в организме экспериментальных животных в рамках комплекса доклинических исследований.

Ключевые слова: генная терапия; плазмида; диссеминация; ПЦР в реальном времени; мыши

Для цитирования:
Джауари С. С., Карагяур М. Н., Балабаньян В. Ю., Скрябина М. Н., Примак А. Л., Стамбольский Д. В., Разработка подходов для исследования биораспределения бицистронной терапевтической плазмидной конструкции в организме мыши. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(2):46–57. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-46-57
Поступила: 10 июня 2022 г. **Принята:** 12 июня 2022 г. **Опубликована:** 30 июня 2022 г.

Development of approaches for studying the biodistribution of a bicistronic therapeutic plasmid construct in the mouse body

Dzhauari SS[1], Karagyaur MN[1,2], Balabanyan VYu[1,2], Skryabina MN[1], Primak AL[1], Stambolsky DV[3]

[1]– Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[2] – Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[3] – Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. *Relevance*. The use of gene therapy drugs for the treatment of genetic diseases and stimulation of regeneration processes is lengthy and involves repeated injections, which may lead to increased dissemination of gene therapy constructs from the injection site and undesirable ectopic expression of growth factors encoded in them. Existing approaches to study the pharmacokinetics of a drug to assess the dissemination of a gene therapy drug from the site of administration are not applicable. *Objective*: to evaluate the suitability of the real-time PCR method for studying the biodistribution of a promising gene therapy drug in mice during a course of use. *Methods*. Male F1 CBA×C57/Black mice after nerve injury were injected with the test plasmid into the denervated tibial muscle after nerve injury, as well as after 4, 9 and 13 days at a dosage of 60 and 120 µg/mouse. After 7, 14, and 28 days, organ and tissue samples were removed, total DNA was isolated, and plasmid DNA content was assessed by real-time PCR. *Results*. We have shown that the studied genetic construct is able to disseminate from the injection site. We have found that the peak of dissemination for this construct in the organs and tissues of the mouse is reached 14–28 days after the end of the course application, while ectopic expression of growth factors is not observed in them. *Conclusion*. The proposed method is specific, highly sensitive, and linear over a wide range of concentrations. Thus, it can be recommended for studying the biodistribution of potential gene therapy drugs in the body of experimental animals as part of a preclinical studies complex.

Keywords: gene therapy; plasmid; dissemination; RealTime PCR; mice

For citations:
Dzhauari SS, Karagyaur MN, Balabanyan VYu, Skryabina MN, Primak AL, Stambolsky DV. Development of approaches for studying the biodistribution of a bicistronic therapeutic plasmid construct in the mouse body. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(2): 46–57. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-2-46-57
Received: June 10, 2022. **Accepted:** June 12, 2022. **Published:** June 30, 2022

Введение / Introduction

Травматические повреждения периферических нервов являются одной из наиболее частых причин стойкой утраты трудоспособности [1, 2]. Для стимуляции регенерации повреждённых нервных волокон ранее нами была создана бицистронная плазмидная конструкция, содержащая кДНК нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) [3], которая получила название pNCure (plasmid for Nerve Cure). В связи с тем, что процесс прорастания нервных волокон от места повреждения к своим мишеням занимает от нескольких месяцев до года, и что время эффективной экспрессии векторных конструкций на основе плазмид ограниченно несколькими неделями [4, 5], для стимуляции посттравматической реиннервации нами был выбран многократный режим введения. При дизайне исследования нами было учтено, что регенерация нерва у мыши происходит намного быстрее, чем у человека. В связи с этим мы выбрали четырёхкратный режим введения в двух экспериментальных дозах (сразу после повреждения, а также через 4, 9 и 13 дней после повреждения нерва по 60 или 120 мкг/мышь).

Разработка терапевтической векторной конструкции, кодирующей факторы стимулирующие регенерацию, подразумевает изучение её биобезопасности, в связи с рисками, ассоциированными с длительной и возможно эктопической экспрессией белков, стимулирующих нежелательную клеточную пролиферацию и миграцию [6, 7].

В рамках доклинического изучения биологической безопасности мы исследовали распределение генотерапевтического лекарственного кандидата при повторном внутримышечном введении.

Материалы и методы / Materials and methods

Объектом исследования являлась субстанция, представляющая собой бесцветный прозрачный раствор плазмидной конструкции pNCure в изотоническом растворе натрия хлорида с концентрацией 2 мг/мл.

Животные

Самцы мышей F1 CBA×C57/Black, 23–25 г, 26 голов: 24 для изучения биораспределения, 2 – для получения контрольных образцов органов и тканей. Животных содержали и использовали для экспериментальных процедур в соответствии с Директивой 2010/63/EC и рекомендациями Комитета по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова.

Введение препарата

При выборе доз для изучения способности генетической конструкции диссеминировать из места введения мы ориентировались на дозы, использованные и показавшие себя как терапевтически эффективные при изучении специфической активности данной конструкции [3]. После повреждения общего малоберцового нерва (n. peroneus communis), а также через 4, 9 и 13 дней животным делали инъекции pNCure в денервированную большеберцовую мышцу в дозировке 60 или 120 мкг/животное.

Отбор и процессинг образцов органов и тканей

Через 1, 2 и 4 недели после окончания курса внутримышечных инъекций мышей подвергали эвтаназии по методу цервикальной дислокации. У животных забирали образцы крови (300–400 мкл), лёгких, печени, почек, селезёнки, сердца, головного мозга, и мышечной ткани как из места введения (передняя большеберцовая мышца на левой задней конечности) так и из контралатеральной конечности (передняя большеберцовая мышца на правой задней конечности).

Образцы органов и тканей лизировали при 56 °C в течение 18–24 часов (до полного растворения) в 200 мкл раствора, содержащего 50 мМ Tris (pH 8,0), 100 мМ ЭДТА, 0,5 % SDS и 0,7 мг протеиназы K на 1 мл раствора. Полученные лизаты разводили деионизованной водой в 10 раз и использовали в качестве матрицы для ПЦР в режиме реального времени из расчёта 1 мкл на 25 мкл реакционной смеси.

Образцам крови давали свернуться, позволяя сыворотке крови отделиться от тромба. Затем пробирки со свернувшейся кровью центрифугировали при 10000 g в течение 15 минут. Из отделившейся сыворотки крови ДНК выделяли фенол-хлороформным методом с последующим переосаждением изопропанолом и восстановлением деионизованной водой до исходного объёма сыворотки крови.

Оценка диссеминации плазмидной ДНК – принцип метода

Оценку диссеминации плазмидной ДНК из места введения в органы и ткани оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Для этого использовали приведённые в табл. 1 пары праймеров, специфичные к последовательности плазмидной конструкции и к геномной ДНК мыши. Амплификацию проводили с помощью набора qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген), согласно инструкции производителя (объём смеси 25 мкл), в CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Валидация методики анализа содержания плазмидной и геномной ДНК в образцах сыворотки крови, образцов органов и тканей

Валидация методики количественного определения бицистронной генетической конструкции в органах и тканях экспериментальных животных была выполнена по аналогии с опубликованными методиками определения остаточных количеств лекарственных веществ и их метаболитов в органах и тканях животных [8–13]. В рамках валидации была оценена линейность и специфичность предложенной методики, а также степень извлечения, пределы количественного и качественного определения бицистронной генетической конструкции.

Таблица 1

Праймеры использованные для амплификации плазмидной и геномной ДНК мыши в реакциях ПЦР в реальном времени

Table 1

Primers used for pNCure plasmid and murine genomic DNA amplification in Real Time-PCR

Пара праймеров / Pair of primers	Название праймера / Primer name	Последовательность праймера / Primer sequence	Расчётная температура плавления / Annealing temperature	Длина ампликона / Amplicon length
Детекция плазмидной ДНК / Plasmid DNA detection	pNCure-f	CATCACCAACTGGGACGACA	59 °C	180 п.о.
	pNCure-r	TAGCCACATACATGGCAGGC	59 °C	
Детекция геномной ДНК / Genomic DNA detection	Acta1-f	CAGTGCCGAACTACCCAGT	60 °C	180 п.о.
	Acta1-r	CAGGGGAGTGATCTATGGTGG	60 °C	

Для построения калибровочных кривых проводили ПЦР в реальном времени с использованием в качестве матрицы растворов плазмиды pNCure в предварительно полученных экстрактах сыворотки крови и лизатов анализируемых органов и тканей с концентрациями 0,5 нг/мкл, 5 пг/мкл, 50 фг/мкл или 0,5 фг/мкл. 1 мкл полученного раствора добавляли в реакционную смесь для проведения ПЦР в реальном времени. Каждую серию анализов проводили в 3 независимых повторах. Для получения калибровочных графиков использовали логарифмическую интерполяцию – $y = k*ln(x) + A$ зависимости порогового цикла (ΔCt) от количества внесённой плазмидной ДНК. Полученные данные нормировали на уровень сигнала, полученного для геномной ДНК мыши (праймеры Acta1-f и Acta1-r) в соответствующих образцах.

Для оценки эффективности экстракции плазмидной ДНК из сыворотки крови мы вносили изучаемую плазмиду pNCure в количестве 0,5 нг/мкл, 5 пг/мкл, 50 фг/мкл, 0,5 фг/мкл в образцы сыворотки крови объёмом 200 мкл. После этого проводили экстракцию, согласно описанному выше протоколу, с восстановлением объёма деионизованной водой до 200 мкл. Полученные экстракты анализировали с помощью ПЦР в реальном времени, нормировали полученные данные на уровень сигнала для геномной ДНК мыши и сравнивали с результатами калибровки плазмидной ДНК в сыворотке крови. Поскольку экстракции ДНК из образцов органов и тканей мышей не проводилось (лишь лизис и разбавление лизатов в 10 раз), то и эффективность экстракции плазмидной ДНК из образцов органов и тканей не оценивали.

Определение количества плазмидной ДНК в образцах органов и тканей

На основании полученных калибровочных графиков плазмидной ДНК в образцах крови, органов и тканей мышей определяли количество плазмидной ДНК в экспериментальных образцах органов и тканей с помощью уравнения:

$$\mathbf{P = e^{((\Delta Ct - A)/k)}},$$

где: P – искомое количество плазмидной ДНК в экспериментальном образце;

ΔCt – значение порогового цикла для соответствующего образца;

A и *k* – коэффициенты из уравнения – $y = k*ln(x) + A$, описывающего калибровочную кривую.

Определение пределов чувствительности (LOD) и количественного определения (LOQ) ПЦР-метода детекции плазмидной ДНК

Для определения пределов детектирования (Limit of Detection, LOD) и пределов количественного определения (Limit of Quantification, LOQ) плазмидной ДНК использовали данные измерений, полученные в ходе валидации методики при анализе «холостых» проб лизатов и экстрактов, не содержащих плазмидную ДНК. LOD оценивается как количество плазмидной ДНК в реакционной смеси, соответствующее утроенному среднему значению Δ*Ct* (в трёх повторах), полученному при анализе «холостых» проб лизатов или экстрактов, а LOQ – количество плазмидной ДНК, соответствующее десяти средним значениям ΔCt, полученных при анализе «холостых» проб (в трёх повторах). Формулы для вычисления LOD и LOQ приведены ниже:

$$\mathbf{LOD = 3*e^{((\Delta Ct - A)/k)}}$$

$$\mathbf{LOQ = 10*e^{((\Delta Ct - A)/k)}},$$

где: LOD – предел детектирования;

LOQ – предел количественного определения;

ΔCt – значение порогового цикла для соответствующего образца;

A и *k* – коэффициенты из уравнения – $y = k*ln(x) + A$, описывающего калибровочную кривую.

Иммуноферментный анализ гомогенатов органов и тканей мыши на содержание BDNF

Возможную эктопическую экспрессию факторов роста оценивали по уровню основного белка, закодированного в плазмиде pNCure – BDNF. Для этого использовали набор для иммуноферментного анализа Human Free BDNF Immunoassay (R&D, #DBD00). Анализ проводили в гомогенатах отдельных образцов органов и тканей с наибольшим содержанием плазмидной ДНК, согласно инструкции производителя.

Результаты / Results

Валидация методики ПЦР-детекции плазмидной ДНК в органах и тканях мыши

Результаты калибровки плазмиды pNCure в экстрактах сыворотки крови и лизатах лёгких приведены в табл. 2, 3 и на рис. 1, 2. Результаты калибровки в лизатах других органов и тканей приведены в разделе Дополнительные материалы (табл. Д1–Д6, рис. Д1–Д6) и в табл. 5. В эксперименте также анализировали образцы, содержащие плазмидную ДНК в количестве 5 аттограмм/мкл, однако полученные для них параметры ΔCt оказались ниже предела чувствительности метода и потому не отражены в таблицах и на рисунках.

Таблица 2

Калибровка плазмиды pNCure в экстракте сыворотки крови

Table 2

Calibration of pNCure plasmid in serum extract

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,73	11,03	11,49	11,08 ± 0,38
5.0E-03	17,33	17,25	18,46	17,68 ± 0,68
5.0E-05	25,12	24,62	24,85	24,86 ± 0,25
5.0E-07	29,24	30,1	29,09	29,48 ± 0,55

Таблица 3

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах лёгких

Table 3

Calibration of pNCure plasmid in lung lysat

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,79	10,75	10,81	10,78 ± 0,03
5.0E-03	17,89	17,97	17,62	17,83 ± 0,18
5.0E-05	24,24	23,39	23,82	23,82 ± 0,43
5.0E-07	25,15	25,38	25,41	25,31 ± 0,14

Полученные результаты подтверждают линейность методики определения бицистронной генетической конструкции в широком спектре органов и тканей (биологических матриц) экспериментальных животных в диапазоне концентраций 0,5 фг/мкл – 0,5 нг/мкл. Эффективность экстракции плазмиды pNCure из об-

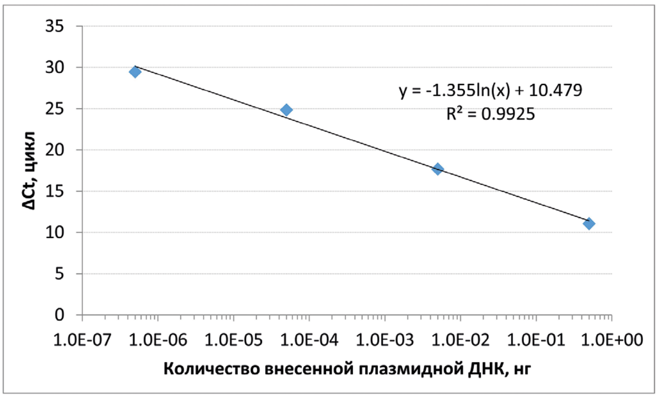


Рис. 1. Калибровка плазмиды pNCure в экстракте сыворотки крови

Fig. 1. Calibration curve for pNCure plasmid in serum extract

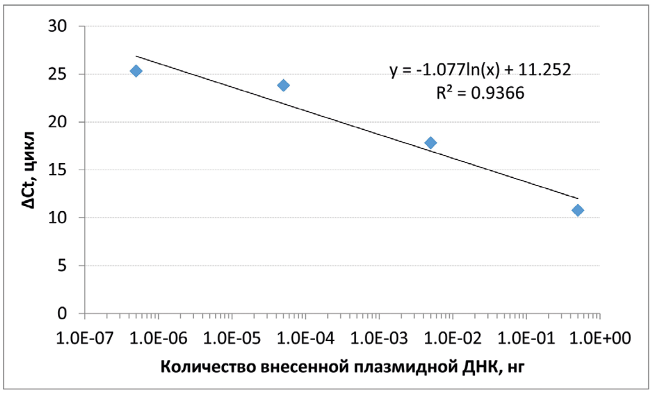


Рис. 2. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах лёгких

Fig. 2. Calibration curve for pNCure plasmid in lung lysat

разцов сыворотки крови составляет более 75 %, что подтверждает пригодность данного метода анализа для обнаружения плазмидной ДНК в образцах сыворотки крови мыши (табл. 4 и рис. 3).

Уравнения, калибровочные коэффициенты и показатели линейности, полученные в ходе валидации ПЦР-метода детекции плазмидной ДНК, отражены в табл. 5. Показатели пределов чувствительности (LOD) и количественного определения (LOQ) метода приведены в табл. 6.

Изучение диссеминации плазмидной ДНК из места введения

Результаты валидации позволили установить закономерности между содержанием плазмидной ДНК в образцах органов и тканей и показателями ПЦР в реальном времени, а также установить параметры чувствительности метода ПЦР-детекции плазмидной ДНК. Валидированная методика позволила оценить содержание искомой плазмидной ДНК в сыворотке крови, а также образцах органов и тканей экспериментальных животных. Результаты диссеминации плазмидной ДНК из области инъекции спустя 7, 14

Таблица 4

Оценка эффективности экстракции плазмиды pNCure из образца сыворотки крови

Table 4

Estimating the efficacy of pNCure plasmid extraction from serum blood sample

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	Параметр / Parameter	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2/ Sample № 2	Образец № 3/ Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	ΔCt, цикл	11,83	11,5	11,39	11,57 ± 0,23
	Ст.экстр., %	62,5	79	84,5	75,33 ± 11,45
5.0E-03	ΔCt, цикл	17,77	18,25	18,41	18,14 ± 0,33
	Ст.экстр., %	95,5	71,5	63,5	76,83 ± 16,65
5.0E-05	ΔCt, цикл	25,06	24,85	25,42	25,11 ± 0,29
	Ст.экстр., %	90	100,5	72	87,5 ± 14,41
5.0E-07	ΔCt, цикл	30,2	30,04	29,64	29,96 ± 0,29
	Ст.экстр., %	64	72	92	76 ± 14,42

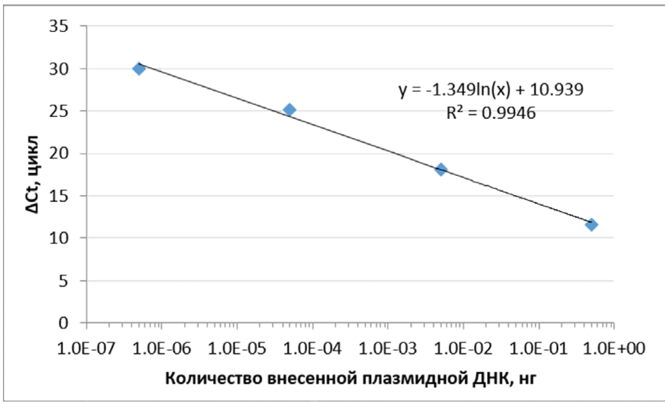


Рис. 3. Калибровка плазмиды pNCure в сыворотке крови (с последующей экстракцией)
Fig. 3. Calibration curve for pNCure plasmid in serum after extraction

и 28 дней после окончания курсового введения бицитронной конструкции pNCure приведены в табл. 7 и 8.

Из полученных результатов видно, что в большинстве образцов плазмидная ДНК отсутствует или находится ниже предела количественного определения. В некоторых образцах были обнаружены следовые количества плазмидной ДНК. Поскольку генетическая конструкция кодирует факторы роста BDNF и uPA, необходимо было выяснить способны ли обнаруженные количества плазмидной ДНК приводить к эктопической экспрессии данных белков. Для этого в гомогенатах отдельных образцов органов и тканей с наибольшим содержанием плазмидной ДНК исследовали содержание основного рекомбинантного белка, закодированного в данной генетической конструкции — мозгового нейротрофического фактора человека BDNF.

Таблица 5

Уравнения, калибровочные коэффициенты и показатели линейности (R^2), полученные в результате валидации ПЦР-метода детекции плазмидной ДНК в органах и тканях мыши

Table 5

Equations, calibration coefficients and linearity indices (R^2) obtained as a result of the validation of the PCR method for the detection of plasmid DNA in organs and tissues of mice

Орган / ткань / organ/tissue	Уравнение калибровки / Equation	k	A	R^2
Лёгкие / lungs	y=–1,08ln(x)+11,25	–1.08	11,25	0,9366
Почки / kidneys	y=–1,33ln(x)+10,24	–1,33	10,24	0,9923
Мозг / brain	y=–1,34ln(x)+10,2	–1,34	10,20	0,9944
Печень / liver	y=–1,30ln(x)+10,33	–1,30	10,33	0,975
Сердце / heart	y=–1,19ln(x)+10,79	–1,19	10,79	0,9697
Селезёнка / spleen	y=–1,13ln(x)+10,94	–1,13	10,94	0,9453
Мышцы / muscle	y=–1,20ln(x)+ 11,40	–1,20	11,40	0,9479
Сыворотка крови / serum	y=–1,35ln(x)+10,94	–1,35	10,94	0,9946

Результаты исследования содержания рекомбинантного BDNF в органах и тканях мышей с наибольшим содержанием плазмидной ДНК не показали повышения уровня его экспрессии. Содержание BDNF выше предела чувствительности метода было установлено лишь в образце большеберцовой мышцы, в которую непосредственно делали инъекции генетической конструкции pNCure (табл. 9).

Обсуждение / Discussion

Процессы восстановления повреждённой ткани требуют продолжительной экспрессии факторов, стимулирующих процессы регенерации. Поскольку продукция эндогенных прорегенераторных белков в области повреждения зачастую недостаточна и кратковременна, это ограничивает врождённый регенераторный потенциал органов и тканей человека. Одним из перспективных подходов для поддержания уровня таких факторов является генная терапия конструкциями, несущими гены таких факторов. Причём,

Таблица 6

Пределы чувствительности (LOD) и количественного определения (LOQ) ПЦР-метода детекции плазмидной ДНК

Table 6

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the PCR method for the detection of plasmid DNA

Показатель	Лёгкие / lungs	Почка / kidneys	Мозг / brain	Печень / liver	Сердце / heart	Селезёнка / spleen	Интактная мышца / intact muscle	Мышца / muscle	Сыворотка крови / serum
Средняя ΔCt, цикл / Mean ΔCt, cycle	24,67	26,06	24,19	26,18	24,82	24,84	25,66	24,17	30,28
LOD, нг	1,1E-03	2,1E-04	8,1E-04	1,4E-04	2,1E-04	1,4E-04	2,1E-04	7,2E-04	1,3E-05
LOQ, нг	3,7E-03	6,8E-04	2,7E-03	4,6E-04	6,9E-04	4,6E-04	6,9E-04	2,4E-03	4,2E-05

Таблица 7

Количество плазмидной ДНК pNCure в исходных образцах сыворотки крови, образцах органов и тканей, млн. копий на 1 г (мл) органа и ткани

Table 7

The amount of pNCure plasmid DNA in serum samples, organ and tissue samples in millions of copies per 1g(ml) of organ or tissue

Дни после окончания инъекции Days after the injection course	Мышь № / Mouse ID	Количество плазмидной ДНК pNCure в исходных образцах сыворотки крови, образцах органов и тканей, млн.копий на 1 г (мл) органа и ткани / The amount of pNCure plasmid DNA in serum samples, organ and tissue samples in mln of copies per 1g (ml) of organ or tissue								
		Лёгкие / Lungs	Почки / Kidneys	Мозг / Brain	Печень / Liver	Сердце / Heart	Селезён-ка /Spleen	Интактная мышца / Intact muscle	Инъек-ционная мышца / Muscle	Плазма крови / Serum
	–К	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7-й	pNCure_1 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3177,9	<LOQ
	pNCure_1 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2164,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_1 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1342,6	<LOQ	<LOQ	12457,3	<LOQ
	pNCure_1 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	20574,5	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8111,4	<LOQ
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	32827,9	<LOQ
	pNCure_2 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	25118,8	<LOQ
14-й	pNCure_1 #1	7612,6	7047,1	<LOQ	1785,5	<LOQ	<LOQ	2811,9	5275,0	9,5
	pNCure_1 #2	<LOQ	2991,6	<LOQ	835,3	3063,3	<LOQ	2186,5	4417,9	9.4
	pNCure_1 #3	<LOQ	1705,6	<LOQ	2599,1	1311,5	<LOQ	<LOQ	9381,2	3,2
	pNCure_1 #4	<LOQ	2545,1	<LOQ	5715,2	1575,9	932,8	<LOQ	15152,8	1,4
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4885,2	1,7
	pNCure_2 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8482,1	1,1
28-й	pNCure_1 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,8
	pNCure_1 #2	<LOQ	1775,6	4540,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,3
	pNCure_1 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,4
	pNCure_1 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	13593,8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	14612,7	0,8
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1827,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #4	<LOQ	2279,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	948,4	<LOQ	<LOQ	0,8

Таблица 8

Количество плазмидной ДНК pNCure в исходных образцах сыворотки крови (нг/мл), а также образцах органов и тканей (нг/г)

Table 8

The amount of pNCure plasmid DNA in serum samples (ng/ml), organ and tissue samples (ng/g)

Дни после окончания инъекции / Days after the injection course	Мышь № / Mouse id	Количество плазмидной ДНК pNCure в исходных образцах сыворотки крови (нг/мл), образцах органов и тканей (нг/г) / The amount of pNCure plasmid DNA in serum samples (ng/ml), organ and tissue samples (ng/g)								
		Лёгкие / Lungs	Почки / Kidneys	Мозг / Brain	Печень / Liver	Сердце / Heart	Селе-зёнка / Spleen	Интакт-ная мышца / Intact muscle	Инъек-ционная мышца / Muscle	Плазма крови / Serum
	–K	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7-й	pNCure_1 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	19,7	<LOQ
	pNCure_1 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_1 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	8,3	<LOQ	<LOQ	77,2	<LOQ
	pNCure_1 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	127,6	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	50,3	<LOQ
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	203,5	<LOQ
	pNCure_2 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	155,7	<LOQ
14-й	pNCure_1 #1	47,2	43,7	<LOQ	11,1	<LOQ	<LOQ	17,4	32,7	0,058631
	pNCure_1 #2	<LOQ	18,5	<LOQ	5,2	19,0	<LOQ	13,6	27,4	0,058413
	pNCure_1 #3	<LOQ	10,6	<LOQ	16,1	8,1	<LOQ	<LOQ	58,2	0,019976
	pNCure_1 #4	<LOQ	15,8	<LOQ	35,4	9,8	5,8	<LOQ	94,0	0,008879
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	30,3	0,010445
	pNCure_2 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	52,6	0,006862
28-й	pNCure_1 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,010855
	pNCure_1 #2	<LOQ	11,0	28,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,007994
	pNCure_1 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,008608
	pNCure_1 #4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #2	<LOQ	84,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	90,6	0,004953
	pNCure_2 #3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	pNCure_2 #4	<LOQ	14,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,9	<LOQ	<LOQ	0,005156

согласно современным представлениям о регенеративных процессах, для их эффективной стимуляции нужна длительная экспрессия таких факторов, что подразумевает повторные инъекции локально экспрессирующихся генетических конструкций. Поскольку такие генетические конструкции несут гены факторов роста и могут потенциально вызывать нежелательные побочные действия, необходимо тщательно изучить возможность их диссеминации из места введения и возможность их эктопической экспрессии.

В данной работе нами был предложен подход для определения способности бицистронной плазмидной генетической конструкции диссеминировать из места введения после четырёх внутримышечных инъекций. Для этого был использован метод определения плазмидной ДНК в органах и тканях экспериментальных

Таблица 9

Результаты иммуноферментного анализа образцов органов и тканей мышей, характеризующихся содержанием детектируемых количеств плазмиды pNCure, на содержание рекомбинантного мозгового нейротрофического фактора человека

Table 9

The results of enzyme immunoassay of samples of mice organs and tissues characterized by the content of detectable amounts of the pNCure plasmid for the content of recombinant human Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Орган / ткань / Organ/Tissue	Содержание BDNF, нг/г / BDNF Content, ng/g
Лёгкие_pNCure_1#1 (14 дней) / Lungs_pNCure_1#1 (14th day)	<LOD*
Почки_pNCure_1#1 (14 дней) / Kidneys_pNCure_1#1 (14th day)	<LOD*
Печень_pNCure_2#3 (28 дней) / Liver_pNCure_2#3 (28th day)	<LOD*
Печень_pNCure_1#4 (14 дней) / Liver_pNCure_1#4 (14th day)	<LOD*
Сердце_pNCure_1#2 (14 дней) / Heart_pNCure_1#2 (14th day)	<LOD*
Область инъекции_pNCure_1#3 (7 дней) / Injection locus_pNCure_1#3 (7th day)	14,6 ± 3,5

Примечание: * – ниже предела чувствительности метода.
Note: *– below the limit of detection.

животных (мышей) с помощью ПЦР в реальном времени. Данное исследование показало, что данный подход позволяет определить плазмидную ДНК в широком спектре органов и тканей (биологических матриц) мыши в диапазоне концентраций 0,5 фг/мкл – 0,5 нг/мкл. В указанном диапазоне наблюдается высокая степень линейности зависимости концентрации плазмидной ДНК в матрице и показателей ПЦР в реальном времени, а предел чувствительности (количественного определения) данного метода находится в диапазоне 0,042–3,7 фг плазмидной ДНК на 1 мкл лизата или экстракта ткани, в зависимости от типа биологической матрицы.

С помощью данного метода было установлено, что наибольшая концентрация плазмидной ДНК наблюдается в мышце в области инъекции через 7 суток после окончания курса инъекций с постепенным снижением концентрации к 14- и 28-м суткам. Плазмидная ДНК способна диссеминировать в другие органы и ткани мыши, причём пик обнаружения в них плазмидной ДНК наблюдается через 14 суток при дозе 60 мкг/мышь и через 28 суток при дозе 120 мкг/мышь. Предположительно, что такая динамика её диссеминации может быть обусловлена диссеминацией по организму клеток моноцитарно-макрофагального ряда, поглотивших плазмидную ДНК, её фрагменты или фрагменты повреждённых мышечных клеток из области инъекции. Однако проверка данного предположения требует дополнительного исследования. Через 28 суток после окончания инъекций плазмидная ДНК перестаёт определяться в абсолютном большинстве образцов органов и тканей животных, которым делали инъекцию 60 мкг плазмиды.

Эктопическая экспрессия генов рекомбинантных факторов роста может приводить к негативным последствиям, поэтому нами была изучена их экспрессия в тканях с наибольшим содержанием плазмидной ДНК. Иммуноферментный анализ гомогенатов таких органов и тканей показал, что эктопическая экспрессия основного белка BDNF человека отсутствует или находится на уровне ниже предела чувствительности метода.

Таким образом, метод ПЦР в реальном времени продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность для определения количеств плазмидной ДНК или динамики её распределения в организме мыши после инъекции. Поскольку свойства экспрессии, стабильности, токсичности и диссеминации генетической конструкции во многом определяются её нуклеотидной последовательностью, мы считаем необходимым изучать данные параметры для каждого потенциального генотерапевтического препарата в моделях *in vivo*, и предложенный подход может оказаться для этого полезным.

Заключение / Conclusion

1. Метод ПЦР в реальном времени подходит для определения генетических конструкций в тканях животных, что можно использовать для оценки диссеминации генотерапевтических препаратов из места введения.
2. Бицистронная плазмидная конструкция, кодирующая мозговой нейротрофический фактор и урокиназный активатор плазминогена, диссеминирует из места введения после курсового введения, но это не приводит к эктопической экспрессии факторов роста, в ней закодированных.
3. Содержание бицистронной конструкции в области инъекции, в органах и тканях экспериментальных животных снижается с течением времени.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
ADDITIONAL MATERIALS

Таблица Д1

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах почек

Table D1

Calibration of pNCure plasmid in kidneys lysate

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,61	10,65	10,52	10,59 ± 0,07
5.0E-03	17,31	18,51	17,63	17,82 ± 0,62
5.0E-05	24,04	23,86	24,4	24,1 ± 0,27
5.0E-07	28,58	28,91	29,27	28,92 ± 0,35

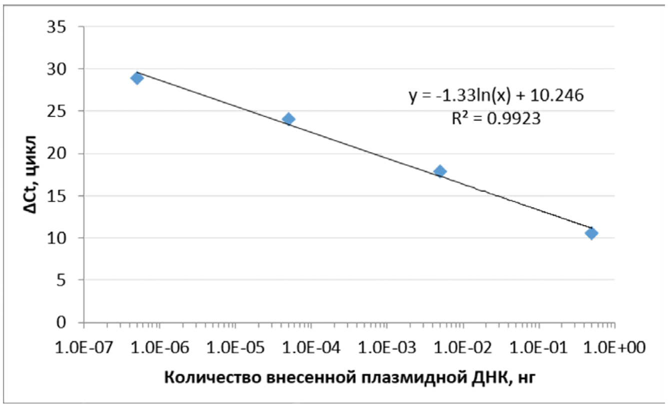


Рис. Д1. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах почек
Fig. Д1. Calibration curve for pNCure plasmid in kidneys lysate

Таблица Д2

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах мозга

Table D2

Calibration of pNCure plasmid in brain lysate

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,66	10,83	10,76	10,75 ± 0,09
5.0E-03	17,62	17,44	17,37	17,48 ± 0,13
5.0E-05	24,18	24,06	24,38	24,21 ± 0,16
5.0E-07	31,09	28,08	27,99	29,05 ± 1,76

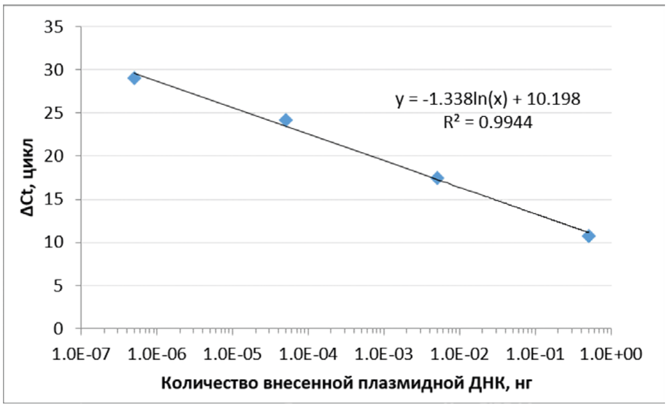


Рис. Д2. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах мозга
Fig. Д2. Calibration curve for pNCure plasmid in brain lysate

Таблица Д3

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах печени

Table D3

Calibration of pNCure plasmid in liver lysate

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,3	10,43	10,38	10,37 ± 0,07
5.0E-03	17,34	17,99	18,01	17,78 ± 0,38
5.0E-05	24,27	24,62	25,12	24,67 ± 0,43
5.0E-07	27,94	28,19	27,92	28,02 ± 0,15

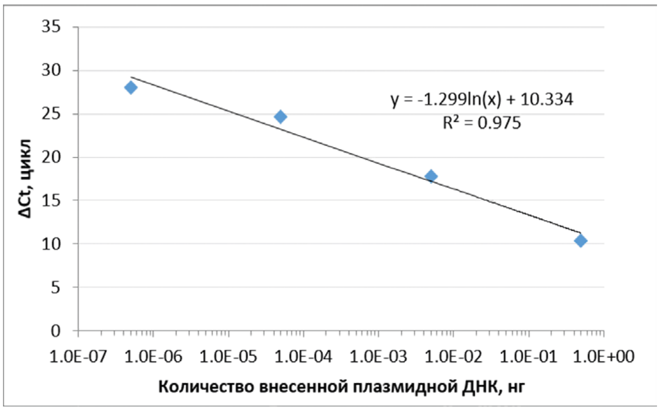


Рис. Д3. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах печени
Fig. Д3. Calibration curve for pNCure plasmid in liver lysate

Таблица Д4

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах сердца

Table D4

Calibration of pNCure plasmid in heart lysate

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,6	11,03	10,79	10,81 ± 0,22
5.0E-03	17,39	17,43	17,69	17,5 ± 0,16
5.0E-05	24,12	24,01	24,13	24,09 ± 0,07
5.0E-07	26,82	26,65	26,95	26,81 ± 0,15

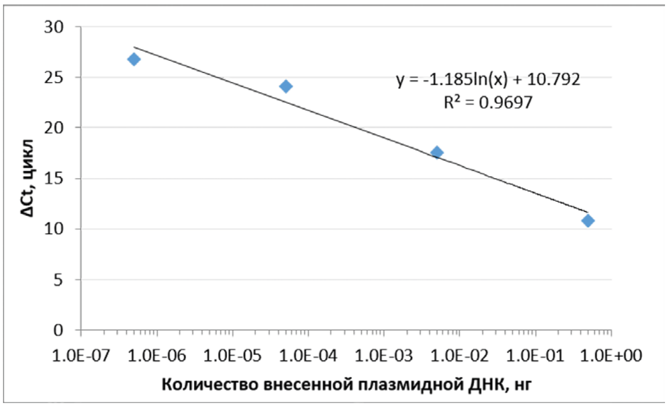


Рис. Д4. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах сердца
Fig. Д4. Calibration curve for pNCure plasmid in heart lysate

Таблица Д5

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах селезёнки

Table D5

Calibration of pNCure plasmid in spleen lysate

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	10,57	10,54	10,56	10,56 ± 0,02
5.0E-03	17,47	18,28	17,49	17,75 ± 0,46
5.0E-05	24,01	24,19	23,92	24,04 ± 0,14
5.0E-07	24,75	26,31	26,49	25,85 ± 0,96

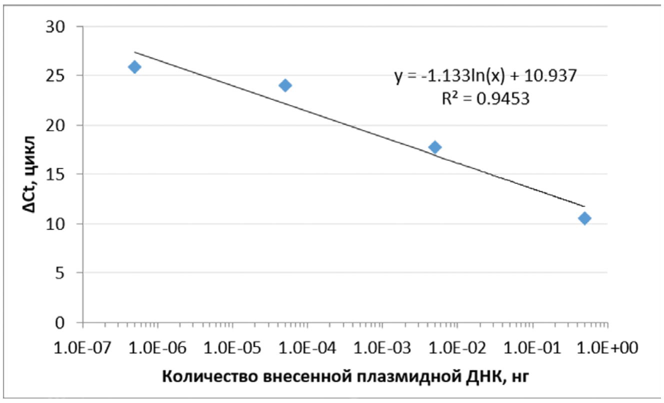


Рис. Д5. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах селезёнки
Fig. Д5. Calibration curve for pNCure plasmid in spleen lysate

Таблица Д6

Калибровка плазмиды pNCure в лизатах мышцы (интактной)

Table D6

Calibration of pNCure plasmid in muscle lysate (intact)

Внесённое количество плазмиды, нг/реакцию / Amount of plasmid in ng per PCR reaction	ΔCt, цикл / ΔCt, cycle			
	Образец № 1 / Sample № 1	Образец № 2 / Sample № 2	Образец № 3 / Sample № 3	Среднее ± ст.откл. / Mean ± SD
5.0E-01	11,43	10,85	10,84	11,04 ± 0,34
5.0E-03	18,79	18,54	18,49	18,61 ± 0,16
5.0E-05	25,29	25,43	25,16	25,29 ± 0,14
5.0E-07	27,31	26,94	27,65	27,3 ± 0,36

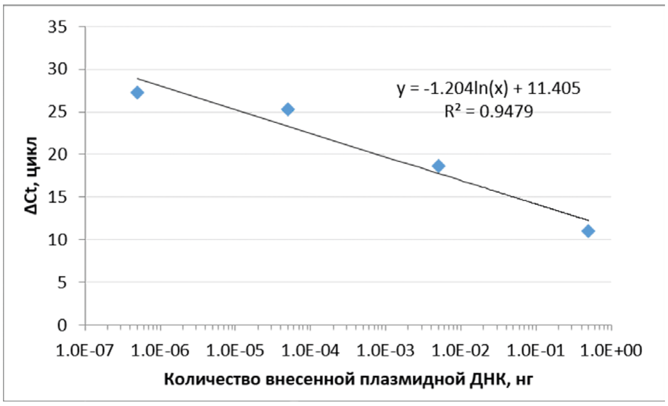


Рис. Д6. Калибровка плазмиды pNCure в лизатах мышцы (интактной)
Fig. Д6. Calibration curve for pNCure plasmid in muscle lysate (intact)

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Отсутствует.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Участие авторов. Джауари С.С. – проведение эксперимента, анализ и обсчёт результатов; Карагяур М.Н. – дизайн эксперимента, анализ и обсчёт результатов, написание текста статьи; Балабаньян В.Ю. – дизайн эксперимента, написание и редактирование текста статьи; Скрябина М.Н. – проведение эксперимента, анализ и обсчёт результатов; Примак А.Л. – проведение эксперимента, анализ и обсчёт результатов; Стамбольский Д.В. – дизайн эксперимента, редактирование текста статьи, получение финансирования для проведения работ.

Participation of authors. Jauari SS – experiments conduction and data processing; Karagyaur MN – experiment design, data processing and article writing; Balabanyan VY – experiment design, article writing and editing; Scriabina MN – experiments conduction and data processing; Primak AL – experiments conduction and data processing; Stambolsky DV – experiment design, article editing and funding acquisition.

Благодарности. Работа выполнена при финасовой поддержке МинПромТорга РФ в рамках реализации Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Acknowledgements. The study was financially supported by the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation as part of the implementation of the Federal target program "Development of the pharmaceutical and medical industries of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond".

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Джауари Сталик Станиславович
e-mail: stalik.djauari@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-5480-2322
SPIN-код: 6990-3656
аспирант кафедры биохимии и молекулярной медицины, ФФМ МГУ, Москва, Россия

Dzhauari Stalik S.
e-mail: stalik.djauari@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-5480-2322
SPIN code: 6990-3656
PhD student of the Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, MSU, Moscow, Russia

Карагяур Максим Николаевич
Автор, ответственный за переписку
e-mail: m.karagyaur@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4289-3428
SPIN-код: 9504-4257
к. б. н., доцент кафедры биохимии и молекулярной медицины, ФФМ МГУ, Москва, Россия; с. н. с. ИРМ МНОЦ МГУ, Москва, Россия

Karagyaur Maxim N.
Corresponding author
e-mail: m.karagyaur@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4289-3428
SPIN code: 9504-4257
PhD Biological Sci., Associate Professor, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, MSU, Moscow, Russia; senior researcher Institute for Regenerative Medicine, Medical research and education center, MSU, Moscow, Russia

Балабаньян Вадим Юрьевич
e-mail: bal.pharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-5744-7060
д. фарм. н., в. н. с., межфакультетская научно-исследовательская лаборатория трансляционной медицины ФФМ МГУ, Москва, Россия; в. н. с. ИРМ МНОЦ МГУ, Москва, Россия

Balabanyan Vadim Yu.
e-mail: bal.pharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-5744-7060
Doctor of Pharmacy, Leading Researcher, Interfaculty Research Laboratory of Translational Medicine, Faculty of Medicine, MSU, Moscow, Russia; Leading Researcher, Institute for Regenerative Medicine, Medical research and education center, MSU, Moscow, Russia

Скрябина Мария Никитична
e-mail: skrebbka@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-3128-2699
студент, лаборант кафедры биохимии и молекулярной медицины, ФФМ МГУ, Москва, Россия

Skryabina Mariya N.
e-mail: skrebbka@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-3128-2699
Student, laboratory assistant of the Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, MSU, Moscow, Russia

Примак Александра Леонидовна
e-mail: primak.msu@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1386-5922
SPIN-код: 3882-8197
аспирант кафедры биохимии и молекулярной медицины ФФМ МГУ, Москва, Россия

Primak Alexandra L.
e-mail: primak.msu@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1386-5922
SPIN code: 3882-8197
PhD student of the Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, MSU, Moscow, Russia

Стамбольский Дмитрий Викторович
e-mail: dstambolsky@mc.msu.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6983-9697
SPIN-код: 1776-1518
к. б. н., в. н. с. отдела научных программ и инновационных технологий медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Stambolsky Dmitry V.
e-mail: dstambolsky@mc.msu.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6983-9697
SPIN code: 1776-1518
PhD Biological Sci., Leading Researcher, Department of Scientific Programs and Innovative Technologies of the Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Одинак М.М., Живолупов С.А. Заболевания и травмы периферической нервной системы. Санкт-Петербург: Издательство «СпецЛит»; 2009. [Odinak MM, Zhivolupov SA. Zabolevaniya i travmy perifericheskoj nervnoj sistemy. Saint-Petersburg: Izdatel'stvo «SpecLit»; 2009. (In Russ).].

2. Шевелев И.Н. Травматические поражения плечевого сплетения. – М.: Издательство «Москва»; 2005. [Shevelev IN. Travmaticheskie porazheniya plechevogo spleteniya. Moscow: Izdatel'stvo «Moskva»; 2005. (In Russ).].

3. Karagyaur M, Rostovtseva A, Semina E, Klimovich P et al. A bicistronic plasmid encoding brain-derived neurotrophic factor and urokinase plasminogen activatorstimulates peripheral nerve regeneration after injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2020;372(3):248–255. DOI: 10.1124/jpet.119.261594.

4. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol*. 2003;27(3):277–324. DOI: 10.1385/MN:27:3:277.

5. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998;18(7):397–405. DOI: 10.1002/(sici)1098-2752(1998)18:7<397::aid-micr2>3.0.co;2-f.

6. Huang Q, Wei H, Wu Z, et al. Preferentially Expressed Antigen of Melanoma Prevents Lung Cancer Metastasis. *PLoS One*. 2016;11(7):e0149640. DOI: 10.1371/journal.pone.0149640.

7. Maripuu A, Björkman A, Björkman-Burtscher IM, Mannfolk P et al. Reconstruction of sciatic nerve after traumatic injury in humans - factors influencing outcome as related to neurobiological knowledge from animal research. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2012 Oct 10;7(1):7. DOI: 10.1186/1749-7221-7-7.

8. EMEA. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.

9. US FDA. Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: methodology. Rockville. MD: Nov 1996.

10. OECD. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. 2005.

11. Schechtman LM. Internationally harmonized processes for test method evaluation. Validation and regulatory acceptance: The role of OECD guidance document 34. Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments, 14, Special Issue. Pp. 475–782 (2008).

12. Хамиде З. Сеньюва, Гилберт Д. Простое руководство для пользователей по разработке и валидации методов / Перевод на русский язык под ред. А. Галкин. – М.: Издательство «ООО Ториус 77»; 2011. [Hamide Z. Senyuva, Gilbert D. Prostoe rukovodstvo dlya pol'zovatelej po razrabotke i validacii metodov / Perevod na russkij yazyk pod red. A. Galkin. Moscow: Izdatel'stvo «OOO Torius 77»; 2011. (In Russ).].

13. Ermer J, Nethercote PW. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. Wiley, 2014.