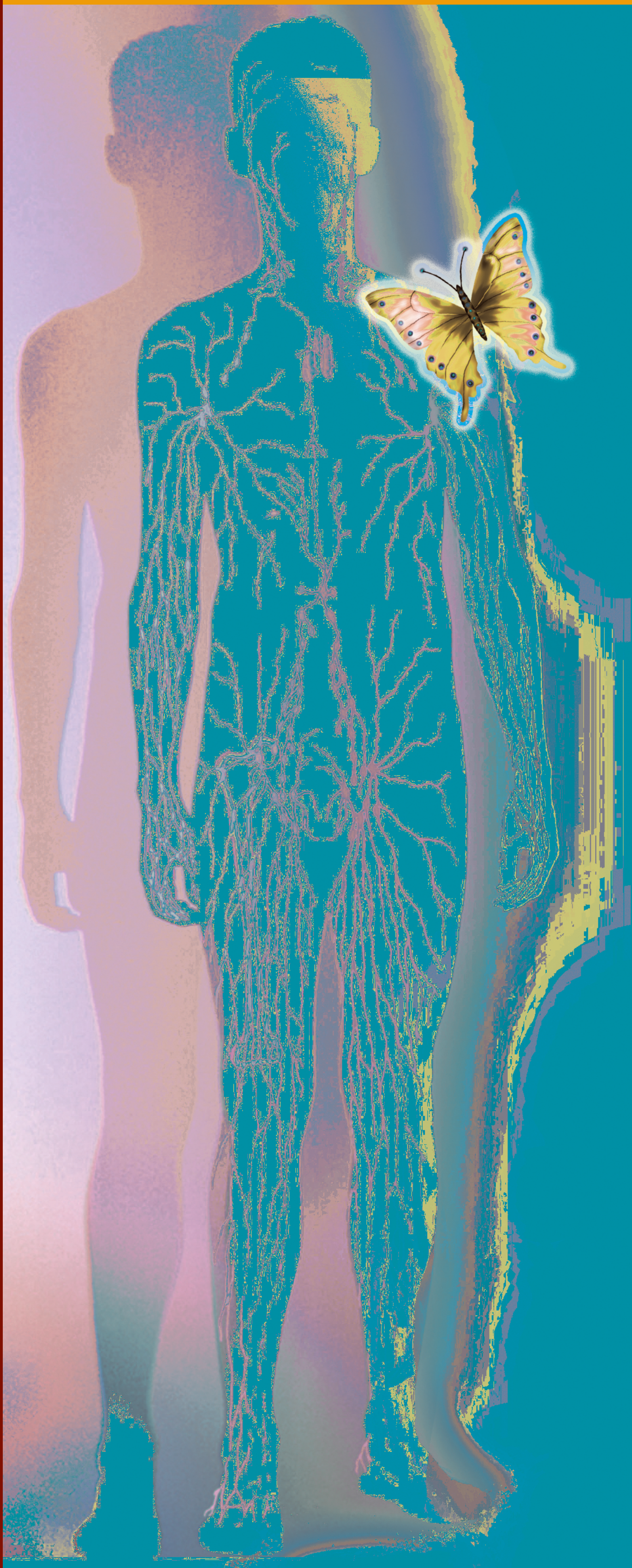
ISSN 2587-7836 (print)
ISSN 2686-8830 (online)

ФАРМАКОКИНЕТИКА и ФАРМАКОДИНАМИКА

Включен в перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ



№3.2022

Реамберин®

НАВСТРЕЧУ ЖИЗНИ

- Сбалансированный сукцинатсодержащий кристаллоидный раствор[1]
- Оказывает дезинтоксикационное, антиоксидантное и антигипоксическое действия[1]
- Нормализует кислотно – основное состояние[1]
- Для взрослых и детей с 1 года жизни[1]

Форма выпуска:
Раствор для инфузий 1,5%, в бутылках стеклянных 400 мл, в контейнерах из многослойной полиолефиновой пленки по 250 или 500 мл. Рег. номер ЛП-№(000863)-(РГ-RU) от 19.05.2022
Реклама.

Ссылки:

1ИНСТРУКЦИЯ по применению лекарственного препарата РЕАМБЕРИН® раствор для инфузий 1,5% МЗ РФ

Научные исследования и статьи по Реамберину доступны на ресурсе PubMed по ссылке:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=reamberin

Polysan

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№3 2022

Издательство ОКИ

Подписано в печать 14.11.2022 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

№3
2022

Издательство ОКИ

Signed in print 14.11.2022 г. **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 3. Блокаторы натриевых каналов

Мокров Г. В.

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

Аннотация. Настоящий обзор продолжает серию обзоров по анализу соединений с кардиопротекторными свойствами в ряду биароматических структур, к которым относится и ряд блокаторов натриевых каналов. Среди потенциал-зависимых натриевых каналов наиболее представленной в сердце является изоформа Nav1.5. Блокаторы натриевых каналов исторически получили название «антиаритмики I класса». Среди соединений этого типа биароматическое строение имеют преимущественно блокаторы позднего тока Nav1.5, относящиеся к подклассу Id антиаритмических средств. Лидерные молекулы из этой подгруппы, такие как ранолазин, GS-458967, и F15845 снижают время восстановления потенциала действия и подавляют триггерную активность, вызванную ранней постдеполяризацией. Они эффективны для лечения стабильной стенокардии и желудочковой тахикардии.

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

Для цитирования:
Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 3. Блокаторы натриевых каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(3):3–9. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-3-9
Поступила: 19 сентября 2022 г. **Принята:** 21 сентября 2022 г. **Опубликована:** 24 октября 2022 г.

Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 3. Sodium channel blockers

Mokrov GV

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. This review continues a series of reviews on the analysis of compounds with cardioprotective properties in a number of biaromatic structures, which include a range of sodium channel blockers. Among voltage-gated sodium channels, the Nav1.5 isoform is the most abundant in the heart. Sodium channel blockers have historically been called "class I antiarrhythmics". Among the compounds of this type, a biaromatic structure mainly have the Nav1.5 late current blockers belonging to the Id subclass of antiarrhythmic drugs. Leader molecules from this subgroup, such as ranolazine, GS-458967, and F15845, reduce action potential recovery time and suppress trigger activity induced by early post-depolarization. They are effective for the treatment of stable angina and ventricular tachycardia.

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

For citations:
Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 3. Sodium channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(3):3–9. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-3-9
Received: September 19, 2022. **Accepted:** September 21, 2022. **Published:** October 24, 2022

Список сокращений

IC_{50} — полумаксимальная ингибирующая концентрация
I_{Kr} — быстрый калиевый ток задержанного выпрямления

Введение / Introduction

В настоящем обзоре представлен анализ данных литературы по кардиопротекторным соединениям с биароматической структурой, обладающих свойствами блокаторов натриевых каналов. Этот обзор является третьей частью серии подобных обзоров. В первой из них рассмотрены блокаторы кальциевых каналов с биароматическим строением [1], а во второй – блокаторы HCN-каналов (циклически-нуклеотид-управляемый канал, активируемый гиперполяризацией) [2].

Потенциал-зависимые натриевые каналы составляют группу мембранных белков, широко распространённых в организме. В сердце есть по крайней мере шесть различных изоформ, наиболее распространённой из которых является Nav1.5 (потенциал-зависимый натриевый канал, изоформа 1.5). Канал состоит из α-субъединицы, которая образована четырьмя доменами (I–IV) по шесть сегментов в каждом и кодируется геном *SCN5A*, и четырёх гораздо меньших β-субъединиц, которые обеспечивают стабильность и интегрируют другие каналы в α-субъединицу.

Ионный ток натрия (I_{Na}) в сердце продуцируются в основном каналами Nav1.5, которые отвечают за создание потенциала действия и быструю деполяризацию сердца [3]. Каналы Nav1.5 могут находиться в трёх состояниях: закрытые, когда мембрана имеет потенциал покоя; открытые, во время деполяризации; и неактивный, в состоянии непроводимости. Инактивация осуществляется благодаря «воротам инактивации», которые находятся во внутриклеточной петле, соединяющей домены III и IV [4]. Кроме того, восстановление в состоянии инактивации происходит во время реполяризации в диастолу [5].

Nav1.5 предпочтительно экспрессируется в предсердиях, волокнах Пуркинье и желудочках, в то же время, их экспрессия в синоатриальном узле и атриовентрикулярном узле низка [6].

Согласно современной классификации антиаритмических средств *Lei M с соавт.*, блокаторы натриевых каналов относятся к I классу и делятся на 4 подкласса [7]. К подклассам Ia и Ib относятся соединения, блокирующие канал Nav1.5 в открытом состоянии с различной степенью констант диссоциации. Такие средства вызывают уменьшение эктопического желудочкового/предсердного автоматизма, снижение проведения по дополнительным путям, увеличение рефрактерного периода, предотвращают «*re-entry*» механизм [8]. Препараты подкласса Ic связываются с Nav1.5 в неактивном состоянии. Они вызывают снижение пикового I_{Na}, повышение порога возбуждения; замедление проведения потенциала действия по предсердиям, желудочкам и проводящим путям; снижение общей возбудимости; пролонгацию длительности потенциала действия при высокой частоте сердечных сокращений; увеличение продолжительности интервала QRS [9]. Соединения подкласса Id блокируют поздний ток Nav1.5. Именно такими свойствами обладает целый ряд биароматических соединений, рассмотренных в настоящем обзоре.

Поздний ток I_{Na} является составной частью натриевого тока, которая сохраняется ещё долго после быстроинактивирующего компонента. Величина позднего I_{Na} относительно мала у всех видов и во всех типах кардиомиоцитов по сравнению с амплитудой быстрого натриевого тока, но вносит значительный вклад в форму и продолжительность потенциала действия (ПД). Было показано, что этот поздний компонент увеличивается при некоторых приобретённых или врождённых состояниях, включая гипоксию, окислительный стресс и сердечную недостаточность, или из-за мутаций в гене *SCN5A*, а также в белках, взаимодействующих с каналами, включая множественные β-субъединицы и якорные белки. У пациентов с усиленным поздним I_{Na} выявляется синдром удлинённого интервала QT 3 типа (LQT3 – синдром удлинённого QT интервала с мутацией гена *SCN5A*), характеризующийся высокой склонностью к опасным для жизни желудочковым аритмиям, таким как Torsade de Pointes (TdP), а также к фибрилляциям предсердий (ФП) [10, 11]. Всё это свидетельствует о том, что поздний I_{Na} является важной терапевтической мишенью для разработки кардиопротекторных препаратов.

Ранолазин и его аналоги / Ranolazine and its analogues

В 1986 г. компанией Syntex Inc. (США) была запатентована группа кардиоселективных арилокси- и арилтио-гидроксипропилен-пиперазинилацетанилидов **1** со свойствами блокады входа кальция, которые были разработаны на основе известных соединений, влияющих на различные физиологические системы, связанные с адренергическим контролем (рис. 1) [12]. Здесь следует отметить, что все соединения в настоящем обзоре окрашены следующим образом: ароматические группы выделены красным цветом, а связывающий их линкер – синим.

К сожалению, результаты изучения связи «структура–активность» внутри этой группы в литературе не представлены, а в 1992 г. были опубликованы результаты клинического исследования лидирного

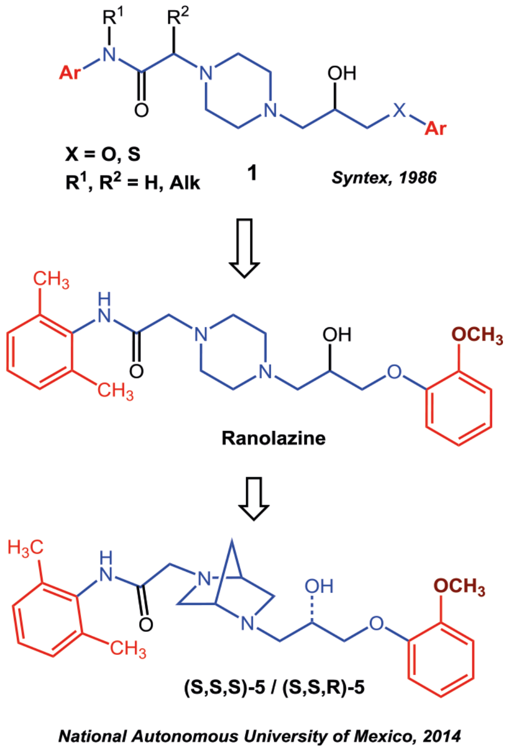


Рис. 1. Ранолазин и его аналоги
Fig. 1. Ranolazine and its analogues

соединения из этой группы, получившего название **ранолазин (RS 43285)**, показавшие его эффективность в качестве антиишемического средства (см. рис. 1) [13]. В 2006 году ранолазин был одобрен FDA для лечения хронической стенокардии. С тех пор ранолазин стал одним из самых распространённых кардиопротекторных средств в мире, который успешно применяется и сегодня [14]. Применение ранолазина не по прямому назначению включает лечение некоторых аритмий, таких как желудочковая тахикардия (ЖТ) [15].

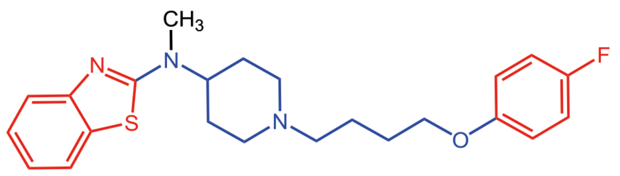
Ранолазин ингибирует позднюю фазу натриевого тока (IC_{50} = 7 μM), которая патологически увеличивается при ишемии (поздний ток Nav1.5). Кроме того, было обнаружено, что ранолазин ингибирует I_{Kr} (канал hERG – канал, кодируемый геном «human ether-a-go-go-related gene») с IC_{50} 12–14 μM, а также блокирует как α-, так и β-адренорецепторы с низкой аффинностью [11].

В молекуле ранолазина первое ароматическое кольцо содержит орто-метоксигруппу, а второе – две орто-метильные группы. Соединяющий их линкер длиной 12 связей имеет целых четыре гетероатома: 3 атома азота, два из которых образуют пиперазиновое кольцо, и один атом кислорода. Кроме того, линкер содержит гидроксильный заместитель и карбонильную группу, что дополнительно повышает гидрофильность молекулы.

Два диазабициклических аналога ранолазина, **(S,S,S)-5** и **(S,S,R)-5**, которые были получены заменой пиперазинового кольца на диазабицикло[2.2.1] гептановый фрагмент, показали сосудорасширяющее действие, причём значительно большее, чем у ранолазина. Сосудорасширяющая активность этих аналогов имеет два компонента: один зависит от эндотелия за счёт высвобождения NO, а другой за счёт прямого действия на гладкую мускулатуру сосудов. Соединения [(S,S,S)(S,S,R)]-5 и (S,S,R)-5, подобно ранолазину, индуцируют высвобождение простаноида из циклооксигеназного пути, сосудосуживающий эффект которого маскируется преимущественной вазодилатацией, вызванной этими соединениями [16].

R-56865

В конце 1980-х годов исследователи из Janssen Pharmaceuticals при изучении ряда веществ с антигипоксантной активностью выявили соединение **R-56865**, обладающее кардиопротекторными свойствами (рис. 2). R-56865 эффективно препятствует развитию аритмий, вызванных ишемией и реперфузией в ряду животных моделей [17]. Позже было показано, что кардиопротекторные свойства R-56865 обусловлены блокадой позднего натриевого тока ($I_{Na,late}$). R-56865 в концентрациях 0,1–10 μM значительно и обратимо снижал индуцированный вератрином ток $I_{Na,late}$ (42,01±8,6 % при 10 μM) в кардиомиоцитах человека [18]. При этом R-56865 не влияет на ток кальция L-типа и ток внутреннего выпрямителя [19, 20].



R-56865

Рис. 2. Структура R-56865
Fig. 2. Structure of R-56865

Молекула R-56865 состоит из ароматических фармакофоров бензотиазола и фторбензола, соединённых линкером из 11 связей, содержащих 3 гетероатома и пиперидиновое кольцо, напоминая структуру ранолазина.

KC-12291

В 1996 г. Kali-Chemie Pharma GmbH (Германия) запатентовала группу биароматических соединений **2**, содержащих пятичленный гетероциклический фрагмент в линкере, в качестве потенциальных лекарственных средств, которые можно использовать для снижения частоты сердечных сокращений (ЧСС) и лечения ишемических состояний сердца. Авторы указывают, что эта серия получена как оптимизированные производные N-метилгомовератриламина (рис. 3). Практически все соединения, представленные в патенте, в концентрациях от 0,55 до 10 μM проявляли брадикардический эффект и цитопротекторный эффект в отношении сокращения предсердий, вызванного гипоксией [21].

В последующих работах было описано лидерное вещество из вышеуказанной серии **KC-12291**, содержащее тиодиазольный гетероцикл в линкере общей длиной в 11 связей, а в качестве ароматических фармакофоров – фенильную и 3,4-диметоксифенильную группы. Было обнаружено, что KC-12291 оказывает умеренное ингибирующее действие на пиковый (или быстрый) ток Na^+ и заметно снижает медленный (или неинактивирующий) ток Na^+. В изолированных желудочковых миоцитах морской свинки KC 12291 (10 μM) достоверно снижал амплитуду быстрого Na^+-тока на 38,2±11,1 % и амплитуду медленного Na^+-тока на 35±9 %. Однако также отмечается, что KC 12291 обладает лишь умеренной селективностью в отношении потенциал-зависимых натриевых каналов сердца по сравнению с потенциал-зависимыми кальциевыми и калиевыми каналами.

В изолированных предсердиях и сердцах с перфузией по Лангендорфу KC 12291 ингибирует диастолическую контрактуру, известную своей устойчивостью к фармакологическому ингибированию, снижает ишемическую нагрузку, вызванную ионами Na^+ и сохраняет энергетический статус сердца. KC 12291 проявляет противоишемическую активность при пероральном приеме *in vivo* при отсутствии значительных гемодинамических эффектов [22, 23]

F15845

В 2008 г. *Le Grand B и соавт.* из исследовательского центра Pierre Fabre Research Center (Франция) разработали группу миметиков трипептида IFM (изолей-

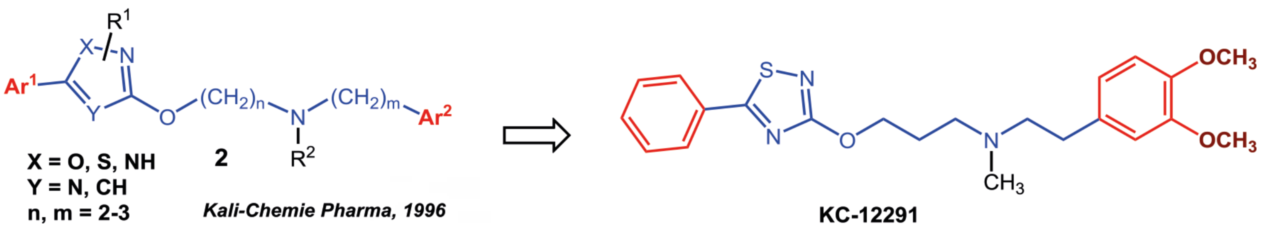


Рис. 3. Создание KC-12291
Fig. 3. Development of KC-12291

цин-фенилаланин-метионин) на основе бензоксатиепинового гетероцикла с целью создания селективных блокаторов Nav1.5. Аминокислоты IFM расположены в III–IV внутренней петле Na^+ канала и играют существенную роль в закрытии канала. Авторы предположили, что резкое усиление позднего натриевого тока при ишемии связано с его неполной быстрой инактивацией из-за затруднения стыковки мотива IFM в месте его связывания внутри поры канала [24]. Это предположение было основано на данных о том, что экзогенные IFM-содержащие пептиды могут восстанавливать быстрое открытие каналов, перешедших в режим медленной инактивации [25].

Дизайн низкоэнергетического конформера миметика IFM с использованием структурных элементов ранолазина привёл к созданию производных 3-амино-1,5-бензоксатиепина **3** с цепью, близкой к прототипу (рис. 4). Оптимизация молекулы впоследствии привела к получению лидерного соединения **F15845**.

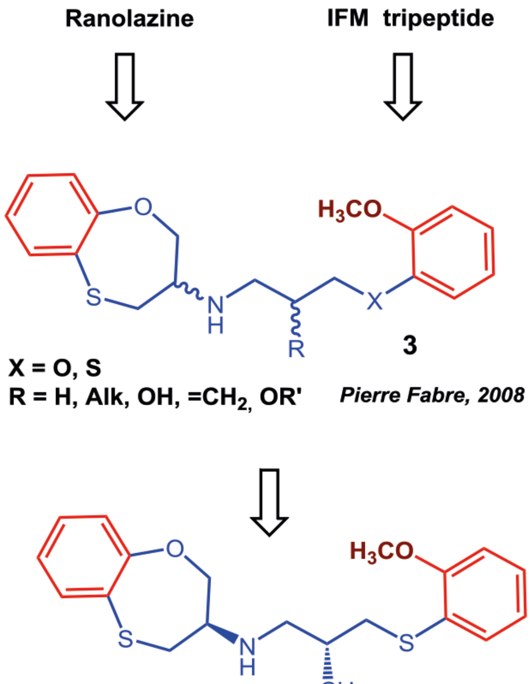


Рис. 4. Дизайн F15845 и его группы
Fig. 4. Design of F15845 and its group

Было показано, что F15845 избирательно ингибирует постоянный ток натрия Nav1.5, оказывая кардиопротекторное действие после ишемии [26]. Тестирование *in vitro* показало минимальное влияние F15845 на другие важные ионные каналы сердца, включая основные каналы Ca^{2+} и K^+ [27]. Предполагается, что указанные свойства объясняют ограниченное влияние F15845 на изменение других параметров сердца, таких как базальная сердечная функция и гемодинамические функции. Было показано, что F15845 особенно эффективен, когда мембранный потенциал деполяризован, действуя на внеклеточную сторону канала. Этот эффект F15845 на деполяризованное состояние постоянного тока натрия делает данный препарат особенно эффективным при ишемических состояниях, когда кардиомиоциты деполяризованы.

F15845 был эффективен в животных моделях для предотвращения фатальной ФЖ и ЖТ во время лигирования коронарных артерий без изменения ЧСС и артериального давления (АД) и дозозависимо увеличивал порог дозы аконитина, необходимый для индуцирования желудочковых аритмий [28]. По данным на 2010 г., F15845 находился на II фазе клинических испытаний в качестве средства для лечения ишемии, однако данные об этом испытании в литературе отсутствуют.

При анализе молекулы соединения F15845 следует отметить, что по сравнению с ранолазином сохраняется метоксифенильный фармакофор, а второе фенильное кольцо не замещено и сопряжено с оксатиепиновым кольцом, входящим в состав линкера длиной в 9 связей. Количество гетероатомов в линкере, как и в ранолазине, довольно велико: два атома серы, атомы азота и кислорода.

Элеклазин и его аналоги / Eleclazine and its analogues

В середине 2010-х годов исследователи из Gilead Sciences Inc (США) развивали программу по поиску ингибиторов позднего натриевого тока в ряду гетероциклических биароматических соединений (рис. 5).

Первоначально *Koltun DO, et al.* провели скрининг библиотеки собственных гетероциклических соединений различных подклассов (примерно 800 соединений) на предмет их ингибирующей активности в отношении позднего тока I_{Na} с использованием автоматической пэтч-клэмп системы. Последовавшие за этим усилия привели к открытию триазолопиридина **GS-458967** (IC_{50} 333 нМ), который, как было обнаружено, имеет хорошую селективность по способности блокировать поздний I_{Na} ток в сравнении с быстрым током натрия [29].

В следующей публикации авторы увеличили площадь полярной поверхности молекулы с 50 до ~80 Å, добавив к ядру карбонильную группу и пятичленное полярное гетероциклическое кольцо, в результате чего была получена группа соединений **4**. Наиболее привлекательным соединением из новой группы оказалось **GS-462808** с оксадиазольным кольцом (IC_{50}(поздний Nav1.5) 1,33 μM), которое имело наилучшие общие свойства в отношении быстрого тока I_{Na} и Nav1.1. Он также в меньшей степени проникал в мозг и по счастливой случайности имел более низкую активность в изоформах мозга. Соединение GS-462808 имело улучшенные характеристики в отношении центральной нервной системы (ЦНС) (>20 крыс и собак) по сравнению с

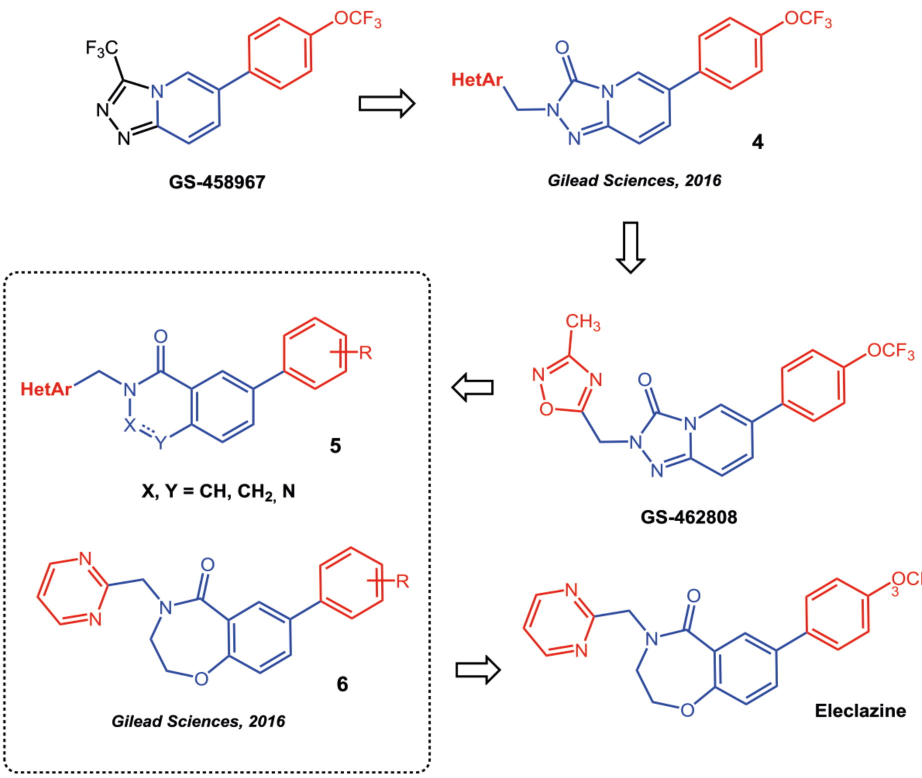


Рис. 5. Ингибиторы позднего натриевого тока, созданные в Gilead Sciences Inc
Fig. 5. Late sodium current inhibitors development by Gilead Sciences Inc

GS-458967 и улучшенную антиишемическую активность по сравнению с ранолазином в моделях на животных. К сожалению, в 7-дневных токсикологических исследованиях на крысах было обнаружено, что GS-462808 обладает метаболическими свойствами, что приводит к поражению печени [30].

Дальнейший поиск селективных ингибиторов позднего натриевого тока в Gilead Sciences был проведён в серии аналогов GS-462808 **5** и **6** с шестичленными и семичленными лактамами, соединёнными с центральным бензольным кольцом. Установлено, что сродство к позднему I_{Na} более выражено у соединений с насыщенным лактамным циклом и в большей степени у производных оксазепинона. Установлено, что оптимальными гетероциклическими заместителями являются пиридин или пиримидин. Пара-трифторметоксигруппа во втором ароматическом кольце также играет существенную роль в сродстве молекул.

Элеклазин (GS-6615; значения IC_{50} 0,62 и 51 μM в отношении блокады $I_{Na,late}$ и $I_{Na,early}$ (ранний натриевый ток), соответственно, в пэтч-кламп экспериментах; практически не влияет на каналы Nav1.1, содержащий трифторметоксифенильную и пиримидиновую группы в качестве ароматических фармакофоров, был выбран на основании анализа связи «структура–активность». Линкер длиной 7 связей включает бензо[f][1,4]оксазепиновый фрагмент.

Элеклазин обеспечивает 100 % ингибирование позднего тока I_{Na} при 1 μM (на основе значений S-T на электрокардиограмме (ЭКГ) кролика), обладает 10-кратной селективностью по сравнению с hERG, не ингибирует β-рецепторы при 10 μM. Это соединение было в 10 раз более аффинным ингибитором позднего тока I_{Na} в клетках, чем ранолазин, и в 22 раза более активным в тесте изолированного сердца *ex vivo*. Элеклазин был в 42 раза более эффективным, чем ранолазин, в снижении ишемической нагрузки *in vivo* (сегмент ST кролика) с 93 % ингибированием при 500 нМ, в то время как ранолазин обеспечивал только 60 % при 12 μM. В модели желудочковой аритмии TdP, индуцированной лекарственными средствами, элеклазин обеспечивал полную кардиопротекцию при 2,4 μM, в то время как ранолазин обеспечивал снижение только на 60 % при 14 μM. Элеклазин не потенцирует индуцированные ишемией аритмии (желудочковые тахикардии и фибрилляции) или смертность, как это наблюдалось при применении других антиаритмических средств класса I в животных моделях [31]. Среди селективных ингибиторов позднего тока I_{Na} элеклазин был единственным кандидатом в лекарственные средства, помимо ранолазина, который прошёл клинические испытания фазы III.

В первом клиническом исследовании (NCT02300558) элеклазин тестировали на безопасность, переносимость и его влияние на укорочение интервала QT у пациентов с LQT3. Первичный результат исследования показал, что через 24 недели средний дневной скорректированный интервал QT был значительно, на 8,5 мс короче, чем в начале исследования, и только у одного пациента было серьёзное нежелательное явление (нефролитиаз). В другом исследовании (LIBERTY-HCM; NCT02291237) изучали влияние элеклазина на толерантность к физической нагрузке у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией. В этом испытании не было доказано, что элеклазин превосходит плацебо. Разработка элеклазина завершилась после того, как были проанализированы результаты исследования TEMPO фазы 2 (NCT02104583). В испытании участвовали пациенты с желудочковыми тахикардиями и фибрилляциями желудочков и имплантируемым кардиовертер-дефибриллятором (ИКД). Результаты исследования показали, что частота разрядов ИКД была выше у субъектов, получавших элеклазин, по сравнению с группой плацебо. Поэтому в конце 2016 г. дальнейшая разработка элеклазина была прекращена по всем показаниям [10].

Выводы по блокаторам натриевых каналов / Conclusions on sodium channel blockers

Анализ структур биароматических соединений со свойствами блокаторов Na^+-каналов позволяет выделить следующие общие характеристики этих молекул (рис. 6). Одна из ароматических групп содержит заместитель с неподелённой парой электронов (LPD),

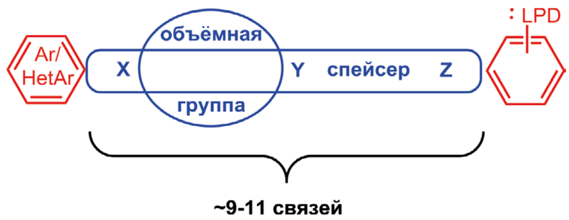


Рис. 6. Модель блокаторов потенциал-зависимых натриевых каналов
Fig. 6. VG Na^+ channel blockers model

чаще всего метоксигруппу, а также трифторметоксигруппу или атом галогена. Второй ароматический заместитель может содержать гетероатомы. Линкер обычно содержит объёмную группу, которая может располагаться как в центральной части линкера, так и рядом с ароматическим заместителем (обычно это кольцо, содержащее гетероатомы). Также следует отметить, что линкер, связывающий ароматические группы, содержит достаточно большое количество гетероатомов (около трёх: X, Y, Z в модели), таких как азот, сера или кислород, длина линкера составляет около 9–11 связей.

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, Cand. Sci. (Chemical), Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 1. Блокаторы кальциевых каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(4):3–17. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 1. Calcium channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(4):3–17. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-4-3-17
2. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 2. Блокаторы HCN-каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(2):03–10. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 2. HCN channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(2):03–10. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2022-2-03-10
3. Beyder A, Rae JL, Bernard C, Strege PR, Sachs F, Farrugia G. Mechanosensitivity of Nav1.5, a voltage-sensitive sodium channel. *J Physiol*. 2010;588(24):4969–4985. DOI: 10.1113/JPHYSIOL.2010.199034
4. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev*. 2005;57(4):411–425. DOI: 10.1124/PR.57.4.5
5. Hugues A. Roles and regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5: Recent insights from experimental studies. *Cardiovasc Res*. 2007;76(3):381–389. DOI: 10.1016/J.CARDIORES.2007.07.019/2/76-3-381-FIG1.GIF
6. Remme CA, Verkerk AO, Hoogaars WMH, et al. The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural heterogeneity in the murine ventricular myocardium. *Basic Res*

Cardiol. 2009;104(5):511–522. DOI: 10.1007/S00395-009-0012-8/FIGURES/6

7. Lei M, Wu L, Terrar DA, Huang CLH. Modernized classification of cardiac antiarrhythmic drugs. *Circulation*. 2018;138(17):1879–1896. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035455

8. Knollmann BC, Roden DM. Antiarrhythmic Drugs. In: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, eds. *Goodman & Gilman's*: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, *13e*. McGraw-Hill Education; 2017. http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1162538774

9. Gillis A, Singh B, Smith T, et al. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*. (Zipes D JJ, ed.). Saunders; 4th edition; 2004.

10. Horváth B, Hézső T, Kiss D, et al. Late Sodium Current Inhibitors as Potential Antiarrhythmic Agents. *Front Pharmacol*. 2020;11:413. DOI: 10.3389/FPHAR.2020.00413

11. Antzelevitch C, Nesterenko V, Shryock JC, Rajamani S, Song Y, Belardinelli L. The role of late I Na in development of cardiac arrhythmias. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;221:137–168. DOI: 10.1007/978-3-642-41588-3_7

12. Kluge AF, Clark RD, Strosberg AM, Pascal JCG, Whiting R. US Patent 4567264. Published online 1986.

13. Cocco G, Rousseau MF, Bouvy T, et al. Effects of a new metabolic modulator, ranolazine, on exercise tolerance in angina pectoris patients treated with beta-blocker or diltiazem. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20(1):131–138.

14. Reed M, Kerndt CC, Gopal S, Nicolas D. Ranolazine. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. StatPearls Publishing; 2021. Accessed October 12, 2021. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507828/

15. Bazoukis G, Tse G, Letsas KP, et al. Impact of ranolazine on ventricular arrhythmias – A systematic review. *J Arrhythmia*. 2018;34(2):124–128. DOI: 10.1002/JOA3.12031

16. López-Ortiz M, Monsalvo I, Demare P, et al. Synthesis of Ranolazine Derivatives Containing the (1S,4S)-2,5-Diazabicyclo[2.2.1]Heptane Moiety and Their Evaluation as Vasodilating Agents. *Chem Biol Drug Des*. 2014;83(6):710–720. DOI: 10.1111/CBDD.12285

17. Garner JA, Hearse DJ, Bernier M. R56865, a potent new antiarrhythmic agent, effective during ischemia and reperfusion in the rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;16(3):468–479. DOI: 10.1097/00005344-199009000-00018

18. Le Grand B, Coulombe A, John GW. Late sodium current inhibition in human isolated cardiomyocytes by R 56865. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;31(5):800–804. DOI: 10.1097/00005344-199805000-00021

19. Létienne R, Vié B, Le Grand B. Pharmacological characterisation of sodium channels in sinoatrial node pacemaking in the rat heart. *Eur J Pharmacol*. 2006;530(3):243–249. DOI: 10.1016/J.EJPHAR.2005.11.035

20. Himmel HM, Wilhelm D, Ravens U. Effects of R56865 on membrane currents in isolated ventricular cardiomyocytes of the guinea-pig. *Eur J Pharmacol*. 1990;187(2):235–240. DOI: 10.1016/0014-2999(90)90010-4

21. Kehrbach W, Mlinaric M, Ziegler D, Brueckner R, Bielenberg W. US Patent 5547967. Published online 1996.

22. John GW, Létienne R, Grand B Le, et al. KC 12291: An Atypical Sodium Channel Blocker with Myocardial Antiischemic Properties. *Cardiovasc Drug Rev*. 2004;22(1):17–26. DOI: 10.1111/J.1527-3466.2004.TB00129.X

23. Decking UKM, Hartmann M, Rose H, Brückner R, Meil J, Schrader J. Cardioprotective actions of KC 12291 I. Inhibition of voltage-gated Na+ channels in ischemia delays myocardial Na+ overload. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998;358(5):547–553. DOI: 10.1007/PL00005291

24. Le Grand B, Pignier C, Létienne R, et al. Sodium late current blockers in ischemia reperfusion: is the bullet magic? *J Med Chem*. 2008;51(13):3856–3866. DOI: 10.1021/JM800100Z

25. Catterall WA. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*. 2000;26(1):13–25. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)81133-2

26. Vié B, Sablayrolles S, Létienne R, et al. 3-(R)-[3-(2-Methoxyphenylthio-2-(S)-methylpropyl]amino-3,4-dihydro-2H-1,5-benzoxathiepine Bromhydrate (F 15845) Prevents Ischemia-Induced Heart Remodeling by Reduction of the Intracellular Na+ Overload. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;330(3):696–703. DOI: 10.1124/JPET.109.153122

27. Vacher B, Pignier C, Létienne R, Verscheure Y, Grand B Le. F 15845 inhibits persistent sodium current in the heart and prevents angina in animal models. *Br J Pharmacol*. 2009;156(2):214–225. DOI: 10.1111/ J.1476-5381.2008.00062.X

28. Pignier C, Rougier JS, Vié B, et al. Selective inhibition of persistent sodium current by F 15845 prevents ischaemia-induced arrhythmias. *Br J Pharmacol*. 2010;161(1):79–91. DOI: 10.1111/J.1476-5381.2010.00884.X

29. Koltun DO, Parkhill EQ, Elzein E, et al. Discovery of triazolopyridine GS-458967, a late sodium current inhibitor (Late INai) of the cardiac NaV 1.5 channel with improved efficacy and potency relative to ranolazine. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(13):3202–3206. DOI: 10.1016/J.BMCL.2016.03.101

30. Koltun DO, Parkhill EQ, Elzein E, et al. Discovery of triazolopyridinone GS-462808, a late sodium current inhibitor (Late INai) of the cardiac Nav1.5 channel with improved efficacy and potency relative to ranolazine. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(13):3207–3211. DOI: 10.1016/J.BMCL.2016.03.096

31. Zablocki JA, Elzein E, Li X, et al. Discovery of Dihydrobenzoxazepinone (GS-6615) Late Sodium Current Inhibitor (Late INai), a Phase II Agent with Demonstrated Preclinical Anti-Ischemic and Antiarrhythmic Properties. *J Med Chem*. 2016;59(19):9005–9017. DOI: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.6B00939

Фармакокинетика нового отечественного антитромбоцитарного препарата из группы ингибиторов гликопротеиновых IIb/IIIa-рецепторов

Фитилёв С. Б.[1], Глухов Ю. Ф.[2], Лукьянов С. В.[2], Казей В. И.[3], Бондарева И. Б.[1], Возжаев А. В.[1], Шкребнева И. И.[1], Клюев Д. А.[1]

[1] – *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия*

[2] — *ООО «Компания «ЭЛТА», Москва, Россия*

[3] — *ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Россия*

Аннотация. *Актуальность*. В рамках проведённого открытого нерандомизированного клинического исследования I фазы изучена фармакокинетика (ФК) первого отечественного оригинального антитромбоцитарного препарата Ангипур из группы непептидных ингибиторов гликопротеиновых IIb/IIIa-рецепторов. *Целью* работы было определение ФК параметров препарата Ангипур при внутривенном введении здоровым добровольцам в однократных разовых дозах. *Методы*. В клиническое исследование I фазы было включено 20 здоровых добровольцев мужского пола. Препарат Ангипур (0,02 % концентрат для приготовления раствора для инфузий) вводился каждому добровольцу 3 дня подряд последовательно в разовых однократных дозах 0,015; 0,05 и 0,09 мг/кг. Далее оценивались основные ФК параметры исследуемого препарата. *Результаты*. Установлено, что после однократного внутривенного введения доз 0,015; 0,05 и 0,09 мг/кг здоровым добровольцам максимальная концентрация препарата Ангипур в плазме крови отмечалась после окончания введения, а через 15 минут она быстро снижалась с последующим медленным снижением в течение 12 ч. Выявлена прямая пропорциональная зависимость основных ФК параметров от величины дозы. После введения исследуемого препарата в дозах 0,015; 0,05 и 0,09 мг/кг AUC_{0-t} составляла в среднем 27,11; 92,04 и 180,39 нг×ч/мл; $AUC_{0-\infty}$ — 37,03; 125,76 и 239,61 нг×ч/мл; C_{max} — 12,44; 46,1 и 92,48 нг/мл; V_d — 304,01; 299,67 и 252,96 л. После введения указанных доз $T_{1/2}$ в среднем был равен 6,72; 6,84 и 6,06 ч; Cl — 32,19; 32,29 и 31,55 л/ч; k_{el} — 0,1073; 0,1109 и 0,1257 1/ч; MRT — 8,94; 8,93 и 8,18 ч, соответственно. *Заключение*. ФК препарата Ангипур в изученных дозах показала свой линейный характер, быстрое достижение значения C_{max} сразу после введения и способность препарата интенсивно распределяться в ткани и биологические жидкости организма.

Ключевые слова: Ангипур; 3-метил-8-(пиперазин-1-ил)-7-(тиетан-3-ил)-1-этил-1Н-пурин-2,6(3Н,7Н)-диона гидрохлорид; здоровые добровольцы; фармакокинетика

Для цитирования:
Фитилёв С. Б., Глухов Ю. Ф., Лукьянов С. В., Казей В. И., Бондарева И. Б., Возжаев А. В., Шкребнева И. И., Клюев Д. А. Фармакокинетика нового отечественного антитромбоцитарного препарата из группы ингибиторов гликопротеиновых IIb/IIIa-рецепторов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(3):10–19. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-10-19
Поступила: 19 сентября 2022 г. **Принята:** 21 сентября 2022 г. **Опубликована:** 24 октября 2022 г.

Pharmacokinetics of a novel anti-platelet drug from the glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors group

Fitilev SB[1], Glukhov YuF[2], Lukyanov SV[2], Kazey VI[3], Bondareva IB[1], Vozzhaev AV[1], Shkrebniova II[1], Kliuev DA[1]

[1] — FGAOU VO «RUDN University», Moscow, Russia

[2] — LLC ELTA Company, Moscow, Russia

[3] — LLC Exacte Labs, Moscow, Russia

Abstract. *Relevance.* As part of the conducted open non-randomized phase I clinical trial the pharmacokinetics (PK) of the first Russian novel antiplatelet agent Angipur (nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor) was studied. *Aim* of the research was to evaluate PK parameters of Angipur in healthy volunteers after single dose ascending infusions. *Methods.* 20 male healthy volunteers were enrolled in this phase I trial. Angipur (0.02% concentrate solution for infusion) was administered to every subject in single doses 0.015, 0.05, 0.09 mg/kg for 3 consecutive days. PK parameters were evaluated. *Results*. After single intravenous administration of doses 0.015, 0.05, 0.09 mg/kg to healthy volunteers the peak plasma concentration of Angipur was reached at the end of the infusion, and then the plasma concentration rapidly decreased 15 minutes after the end of the infusion followed by slow decrease for 12 hours. Dose proportionality for key PK parameters was established. After single infusions of doses 0.015, 0.05, 0.09 mg/kg mean AUC_{0-t} was 27.11, 92.04 and 180.39 ng× h/ml; mean $AUC_{0-\infty}$ – 37.03, 125.76 and 239.61 ng×h/ml; mean C_{max} – 12.44, 46.1 and 92.48 ng/ml; mean V_d – 304.01, 299.67 and 252.96 l; mean $T_{1/2}$ – 6.72, 6.84 and 6.06 h; Cl – 32.19, 32.29 and 31.55 l/h; k_{el} – 0.1073, 0.1109 and 0.1257 l/h; MRT – 8.94, 8.93 and 8.18 h. *Conclusion*. Pharmacokinetics of Angipur in studied doses demonstrated linearity, rapid reaching of C_{max} immediately after the infusion and the high distribution of the drug in tissues and biological fluids of the human organism..

Keywords: Angipur; 3-methyl-8-(piperazin-1-yl)-7-(thietan-3-yl)-1-ethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione hydrochloride; healthy volunteers; pharmacokinetics

For citations:
Fitilev SB, Glukhov YuF, Lukyanov SV, Kazey VI, Bondareva IB, Vozzhaev AV, Shkrebniova II, Kliuev DA. Pharmacokinetics of a novel anti-platelet drug from the glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors group. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(3):10–19. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-10-19
Received: September 19, 2022. **Accepted:** September 21, 2022. **Published:** October 24, 2022.

Введение / Introduction

Атеротромботические события, такие как инфаркт миокарда (ИМ) и ишемический инсульт, являются основной причиной заболеваемости и смертности в промышленно развитых странах [1–3]. Тромбоциты играют ключевую роль в развитии вышеупомянутых неблагоприятных исходов. После разрыва атеросклеротической бляшки они прилипают к обнажённым субэндотелиальным структурам стенки сосуда, пытаясь восстановить целостность сосуда, и тем самым активируются [4, 5]. Активация тромбоцитов приводит к экспрессии поверхностных рецепторов, в частности, Р-селектина и активированного гликопротеина IIb/IIIa, а также к высвобождению содержимого гранул тромбоцитов, что приводит к дальнейшей активации и агрегации тромбоцитов. Этот процесс завершается формированием внутрисосудистого тромба с часто выраженным стенозом сосуда или даже полной окклюзией сосуда и последующей ишемией органа-мишени [4–6]. Для борьбы с развитием данных событий были разработаны терапевтические стратегии для предотвращения нежелательной активации тромбоцитов, в результате чего антитромбоцитарная терапия стала краеугольным камнем вторичной профилактики сердечно-сосудистых осложнений [2, 3, 7–10].

Гликопротеин (ГП) IIb/IIIa является наиболее распространённым рецептором, экспрессируемым на мембранах тромбоцитов. При активации передачи сигналов «изнутри наружу» (“inside-out”) вызывает конформационные изменения в рецепторе, вследствие чего он приобретает сродство к его лигандам, в частности к фибриногену. Затем фибриноген активирует поперечные ГП IIb/IIIa связи между тромбоцитами (ГП IIb/IIIa cross-link between platelets), что приводит к агрегации тромбоцитов [11]. Таким образом, ингибирование ГП IIb/IIIa-рецепторов является очень эффективным подходом в антитромбоцитарной терапии.

Разработка препаратов на базе ингибиторов ГП IIb/IIIa в основном проводилась с 1990 по 2000 гг. В нескольких пилотных исследованиях изучалась фармакокинетика (ФК) и фармакодинамика, некоторых из этих ингибиторов [12–15]. К ним относятся агенты фрагментов антител, такие как абциксимаб, пептидный гликопротеин-имитирующий эптифибатид, а также непептидные антагонисты — тирофибан и ламифибан. Эти ранние исследования показали, что ингибиторы ГП IIb/IIIa-рецепторов эффективно ингибируют агрегацию тромбоцитов без значительного риска кровотечения. При этом результаты современных исследований также предоставляют серьёзную доказательную базу по эффективности применения ингибиторов ГП IIb/IIIa среди пациентов с высоким риском соответствующих сердечно-сосудистых осложнений [16, 17].

Среди доступных на данный момент в обращении препаратов-ингибиторов ГП IIb/IIIa-рецепторов более благоприятным профилем безопасности в контексте риска кровотечений и тромбоцитопении обладают непептидные препараты [18, 19]. Однако на данный момент для отечественной клинической практики единственным доступным препаратом такого класса с 2020 г. остаётся тирофибан. Таким образом, разработка отечественных химиосинтетических ингибиторов ГП IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов является перспективным направлением для разработки соответствующих лекарственных препаратов и проведения их клинических испытаний.

Ангипур (ООО «Компания «ЭЛТА», Россия) представляет собой оригинальный антитромботический низкомолекулярный лекарственный препарат из группы антиагрегантов, полученный путём химического синтеза, механизм действия которого обусловлен ингибированием ГП IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов.

Активная фармацевтическая субстанция (АФС) 3-метил-8-(пиперазин-1-ил)-7-(тиетан-3-ил)-1-этил-1Н-пурин-2,6(3Н,7Н)-диона гидрохлорид, подавляющая агрегацию тромбоцитов, на основе которой разработан препарат Ангипур (Ф-168), синтезирована на кафедре фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (патент RU № 2404181 02.06.2009). На её основе был разработан препарат Ангипур в лекарственной форме — 0,02 % концентрат для приготовления раствора для инфузий. Данное торговое название зарегистрировано 05.12.2018 г. (идентификационный номер 686292).

На базе ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России проведены доклинические исследования АФС и лекарственного препарата Ф-168, в которых изучена фармакокинетика у животных [20, 21]. Статистически значимых отличий между фармакокинетическими параметрами при введении АФС и препарата Ф-168 обнаружено не было.

Результаты доклинических исследований стали основанием для проведения клинического исследования I фазы препарата Ангипур у здоровых добровольцев № 01/17-ELTA, которое было одобрено Минздравом России (разрешение № 566 от 13.11.2018).

Целью настоящей работы было определение фармакокинетических параметров и линейности ФК препарата Ангипур (0,02 % концентрата для приготовления раствора для инфузий) после его внутривенного введения в разовых дозах 0,015 мг/кг, 0,05 мг/кг и 0,09 мг/кг здоровым добровольцам в рамках клинического исследования I фазы.

Материалы и методы / Material and methods

Вышеупомянутое клиническое исследование было проведено на клинической базе кафедры общей и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» — в ГБУЗ г. Москвы «Городская поликлиника № 2 Департамента здравоохранения г. Москвы».

Исследование проводили в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.), Федеральным законом РФ «Об обращении лекарственных средств» № 61-ФЗ от 12.04.2010, Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика», Приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики».

Критериями включения в исследование были:

• мужской пол;

• возраст 18–45 лет;

• индекс массы тела 18,5–28,0 кг/м^2;

• верифицированный диагноз «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования;

• наличие письменного информированного согласия добровольца на участие в исследовании, согласно действующему законодательству.

Основными критериями невключения в исследование являлись: отягощённый аллергологический анамнез; непереносимость действующего вещества или вспомогательных компонентов исследуемого препарата; наличие в анамнезе хронических заболеваний; хирургические вмешательства на желудочно-кишечном тракте в анамнезе; острые инфекционные заболевания в течение 4 недель до начала исследования; отклонения от физиологической нормы данных параметров жизненно-важных функций — артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений, электрокардиограммы (ЭКГ) и лабораторных анализов; приём лекарственных препаратов; алкоголизм, наркомания, токсикомания, положительный анализ мочи на содержание наркотических и психотропных веществ.

Таким образом, в исследование было включено 20 здоровых добровольцев мужского пола в возрасте от 19 до 44 лет (средний возраст 30,8±7,76 лет) с массой тела от 59 до 95 кг (в среднем 77,4±12,06 кг), подписавших информированное согласие (информационный листок добровольца), не получавших сопутствующей терапии и, по результатам скринингового обследования, соответствующих критериям включения/невключения в исследование.

Способ применения и дозы исследуемого препарата

Препарат Ангипур (0,02 % концентрат для приготовления раствора для инфузий) в разведении физиологическим раствором натрия хлорида 0,9 % (в соотношении 1:1) вводился каждому добровольцу 1 раз в день утром 3 дня подряд внутривенно через периферический катетер с помощью перфузионного шприцевого насоса в течение 15 мин последовательно в разовых однократных дозах: 0,015 мг/кг — со скоростью 0,01 мл/кг/мин, 0,05 мг/кг – со скоростью 0,033 мл/кг/мин, 0,09 мг/кг — со скоростью 0,06 мл/кг/мин.

Взятие крови

Забор крови для исследования ФК осуществлялся за 5–15 мин до введения препарата и в следующие временные точки после окончания внутривенного введения каждой дозы исследуемого препарата: через 1 мин ± 30 с (сразу после окончания введения), через 15±1 мин, через 30±1 мин, через 1 час ± 1 мин, через 2 часа ± 1 мин, через 4 часа ± 2 мин, через 7 часов ± 3 мин, через 9 часов ± 4 мин, через 12 часов ± 5 мин. При заборе крови тщательно придерживались указанного времени забора, не выходя за допустимые отклонения.

Метод определения концентрации препарата и его валидация

Количественное определение препарата Ф-168 в плазме крови осуществлялось с помощью высокочувствительного и селективного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ–МС/МС). Аналитическая методика валидирована в биоаналитической лаборатории ООО «Экзактэ Лабс» в соответствии с действующими требованиями [22–28]. Нижний предел количественного определения для Ф-168 составлял не более 100 пг/мл.

Проведение анализа

Анализ образцов проводился аналитическими сериями. За одну серию анализировался следующий набор проб:

• нулевая (холостая) проба, нулевая проба с внутренним стандартом, не менее 7 точек калибровочной кривой с концентрацией, отличной от нуля;

• образцы контроля качества (QCs) в трёх концентрациях (низкая, средняя и высокая), в двух повторах для каждой концентрации;

• образцы плазмы одного добровольца, полученные в ходе исследования.

Определение концентрации аналита

Концентрация аналита в плазме была рассчитана с использованием уравнения (1) и с использованием калибровочной кривой (2):

$$x = \frac{(y - a)}{b}; \qquad (1)$$

$$y = a + bx, \qquad (2)$$

где: y — отношение пика аналита к пику внутреннего стандарта;

x — концентрация аналита в плазме;

a — точка пересечения;

b — наклон соответствующей калибровочной кривой.

Значения a и b были получены методом взвешенной линейной регрессии калибровочной кривой каждой серии. Метод взвешенной линейной регрессии использовался из-за широкого калибровочного диапазона. Значения за пределами нижнего предела количественного определения LLoQ (The lower limit of quantification) расценивались как нулевые и обозначались как BLQ (Below the limit of quantification).

Фармакокинетический и статистический анализ

У каждого добровольца после однократного введения каждой дозы препарата Ангипур в заданные временные точки определена концентрация в плазме крови действующего вещества препарата (3-метил-8-(пиперазин-1-ил)-7-(тиетан-3-ил)-1-этил-1*H*-пурин-2,6(3*H*,7*H*)-диона гидрохлорида), по которым построена кривая «концентрация – время» и с помощью некомпартментного метода рассчитаны следующие фармакокинетические параметры [29]:

- C_{max} (нг/мл) — максимальная концентрация;
- T_{max} (ч) — время достижения максимальной концентрации;
- AUC_{0-t} (нг×ч/мл) — площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нулевого момента (т. е. от начала введения) до последнего момента измерения;
- $AUC_{0-\infty}$ (нг×ч/мл) — площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нулевого момента (т. е. от начала введения) с экстраполяцией до бесконечности;
- k_{el} (1/ч) — константа скорости элиминации;
- $T_{1/2}$ (ч) — период полувыведения;
- V_d (л) — объём распределения;
- Cl (л/ч) — общий (плазменный) клиренс;
- MRT (ч) — среднее время удерживания препарата.

Оценка пропорциональности изменения ФК параметров в зависимости от уровня дозы (dose) проводилась для фармакокинетических показателей AUC_{0-t}, $AUC_{0-\infty}$ и C_{max} на основе модели степенной функции (the power model: $y = a \times dose^b$, *где*: *a – константа и b – константа пропорциональности*), которая после логарифмического преобразования может быть переписана в форме линейной функции $ln(Y) = a + b \times ln(dose)$.

Идеальная пропорциональность с ростом дозы достигается при равенстве коэффициента *b* единице. Таким образом, тестирование пропорциональной зависимости от дозы состояло в проверке статистической значимости отличий оценки коэффициента пропорциональности *b* от единицы.

Предсказанное геометрическое среднее по модели степенной функции для максимальной дозы (*h*) в изучаемом интервале доз можно записать как $e^a \times h^b$, а для минимальной дозы (*l*) $e^a \times l^b$. Пропорциональная зависимость от дозы означает: $e^a \times h^b / e^a \times l^b = h/l$. Формулу можно переписать: $(h/\mathrm{l})^{(b-1)} = R^{(b-1)} = 1$, обозначив *R* отношение наибольшей дозы к наименьшей в изучаемом диапазоне доз. По аналогии с исследованием биоэквивалентности предложен критерий для тестирования пропорциональной зависимости от дозы на основе попадания 90 % доверительного интервала для отношения нормализованных на дозу средних значений (R_{dnm}) внутрь заранее определённых границ (Q_L, Q_H) [30]. Различные подходы могут использоваться для оценки R_{dnm}. Для случая модели степенной функции R_{dnm} может быть оценена как $R^{(b-1)}$, то есть $Q_L < R^{(b-1)} < Q_H$ или $ln(Q_L) < (\mathrm{b}-1) \times ln(R) < ln(Q_H)$. Критический интервал для оценки коэффициента *b* (b_L; b_H) может быть выражен как: $1+\dfrac{Ln(Q_L)}{Ln(R)}$; $1+\dfrac{Ln(Q_H)}{Ln(R)}$.

Вывод о пропорциональной зависимости от дозы делается, когда 90 % доверительный интервал для *b* полностью лежит внутри критической области. Критерий Смита (Smith criteria) [30] используют в качестве граничных значений по аналогии с исследованиями биоэквивалентности: $Q_L = 0{,}8$ и $Q_H = 1{,}25$. *Hummel J и соавт*. продемонстрировали, что эти границы могут оказаться слишком консервативными для поисковых исследований и предложили более широкие границы эквивалентности: $Q_L = 0{,}5$ и $Q_H = 2{,}0$ [31].

Кроме того, регрессионный анализ квадратичной зависимости AUC_{0-t}, $AUC_{0-\infty}$ и C_{max} от дозы продемонстрировал, что для коэффициентов при свободном члене ($dose^0$) и старшем члене ($dose^2$) не наблюдалось статистически значимое отличие от нуля, что также свидетельствует в пользу пропорциональной зависимости для этих фармакокинетических параметров.

Дополнительный анализ проводился для нормированных на дозу значений параметров C_{max} и AUC с помощью модели ANOVA для логарифмически преобразованных данных с дозовым уровнем в качестве фактора.

Дескриптивная статистика и графические методы использовались для сравнения распределений значений $T_{1/2}$, Cl, V_d для различных уровней дозы.

Для представления дескриптивной статистики и графического представления все значения концентраций меньше нижнего предела количественного определения (BLQ) считались равными LLoQ/2 (LLoQ = = 0,1 нг/мл), где: LLoQ — нижний предел количественного определения. Для расчёта фармакокинетических параметров все значения концентраций ниже предела количественного определения (BLQ) игнорировались и считались пропущенными значениями, кроме BLQ значений в лаг-фазе (которые считались равными 0).

Статистический анализ выполнен с помощью программы IBM SPSS Statistics, версия 26.0. Для представления описательной статистики количественных показателей демографических характеристик и ФК параметров использовали среднее (M), стандартное отклонение (SD) и медиану (Me). Статистически значимыми считались различия на уровне значимости 5 %.

Результаты / Results

Средние значения концентрации препарата Ангипур (нг/мл) в соответствующие временные точки забора крови после однократного введения доз 0,015;

0,05 и 0,09 мг/кг приведены в табл. 1. Усреднённые ФК кривые зависимости концентрации от времени при введении разных доз препарата Ф-168 показаны на рис. 1. Как видно из представленных данных, максимальная концентрация препарата в плазме крови отмечалась через 1 мин ± 30 с после окончания введения, через 15±1 мин она быстро снижалась с последующим медленным снижением в течение 12 часов. Концентрация и площадь под кривой «концентрация — время» напрямую зависели от дозы.

Средние значения ФК параметров для трёх доз препарата Ангипур приведены в табл. 2.

Индивидуальные значения и зависимость основных ФК показателей AUC и C_{max} от введённой дозы препарата исследования продемонстрированы на рис. 2–4.

Для ФК параметров AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ было сделано заключение о пропорциональной зависимости от дозы, поскольку 90 % доверительный интервал для коэффициентов пропорциональности *b* ([0,953; 1,072] и [0,906; 1,065], соответственно) включал 1.

В исследовании отношение максимальной к минимальной дозе (*R*) равнялось 6. Кроме того, для ФК параметров AUC оцененные 90% доверительные интервалы для *b* полностью расположились внутри критической области (0,876; 1,124), определяемой в соответствии с критерием Смита ($Q_L = 0{,}8$ и $Q_H = 1{,}25$). Это сравнение позволило сделать вывод о пропорциональной зависимости от дозы параметров AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$.

Поскольку 90 % доверительный интервал для *b* параметра C_{max} [1,021; 1,223] лежал правее единицы и

Таблица 1

Концентрация препарата Ангипур (нг/мл) в зависимости от дозы и времени взятия пробы

Table1

The concentration of the drug Angipur (ng/ml) depending on the dose and time of sampling

Время, ч	Доза		
	0,015 мг/кг, M±SD (Me)	0,05 мг/кг, M±SD (Me)	0,09 мг/кг, M±SD (Me)
0,00	0,050±0,000 (0,050)	0,315±0,1062 (0,307)	0,934±0,3482 (0,938)
0,017	12,430±4,719 (12,380)	46,100±14,296 (45,395)	92,478±33,896 (90,070)
0,25	5,226±1,072 (5,401)	18,927±3,255 (18,840)	34,517±5,410 (33,965)
0,50	4,575±0,726 (4,634)	16,387±2,556 (16,735)	30,337±4,858 (30,220)
1,00	3,914±0,449 (3,983)	13,222±1,939 (12,970)	26,957±4,268 (26,770)
2,00	3,260±0,417 (3,262)	10,933±1,810 (10,590)	21,601±3,871 (21,985)
4,00	2,395±0,309 (2,375)	8,246±1,500 (8,184)	15,712±3,131 (15,725)
7,00	1,700±0,268 (1,675)	5,593±1,090 (5,570)	11,218±3,031 (11,280)
9,00	1,324±0,268 (1,351)	4,374±0,9780 (4,411)	8,979±2,394 (9,091)
12,00	1,002±0,224 (1,012)	3,260±0,8713 (3,247)	6,171±2,191 (6,118)

Таблица 2

Описательная статистика для рассчитанных фармакокинетических параметров после введения доз 0,015; 0,05 и 0,09 мг/кг препарата Ангипур

Table2

Descriptive statistics for calculated pharmacokinetic parameters after administration of doses of 0.015; 0.05 and 0.09 mg/kg of the drug Angipur

ФК параметры	Доза		
	0,015 мг/кг, M±SD (Me)	0,05 мг/кг, M±SD (Me)	0,09 мг/кг, M±SD (Me)
AUC_{0-t}, нг×ч/мл	27,110±3,653 (26,942)	92,040±14,388 (91,800)	180,390±34,354 (185,423)
$AUC_{0-\infty}$, нг×ч/мл	37,030 ± 6,663 (36,870)	125,760±30,163 (124,270)	239,610±72,446 (238,410)
C_{max}, нг/мл	12,440±4,689 (12,380)	46,100±14,295 (45,400)	92,480±33,896 (90,070)
T_{max}, ч	0,066±0,220 (0,017)	0,017±0,000 (0,017)	0,017±0,000 (0,017)
k_{el}, 1/ч	0,107±0,023 (0,104)	0,111±0,033 (0,108)	0,126±0,034 (0,124)
$T_{1/2}$, ч	6,720±1,290 (6,634)	6,840±2,341 (6,390)	6,060±2,287 (5,590)
Cl, л/ч	32,190±6,919 (32,960)	32,290±8,357 (33,060)	31,550±10,113 (33,960)
V_d, л	304,010±55,300 (282,310)	299,670±64,244 (273,210)	252,960±47,790 (251,890)
MRT, ч	8,940±1,670 (8,650)	8,930±2,762 (8,280)	8,180±2,798 (7,330)

Примечания: ФК — фармакокинетика; MRT — mean residence time (среднее время удержания препарата).
Notes: ФК — pharmacokinetic; MRT — mean residence time (average retention time of the drug).

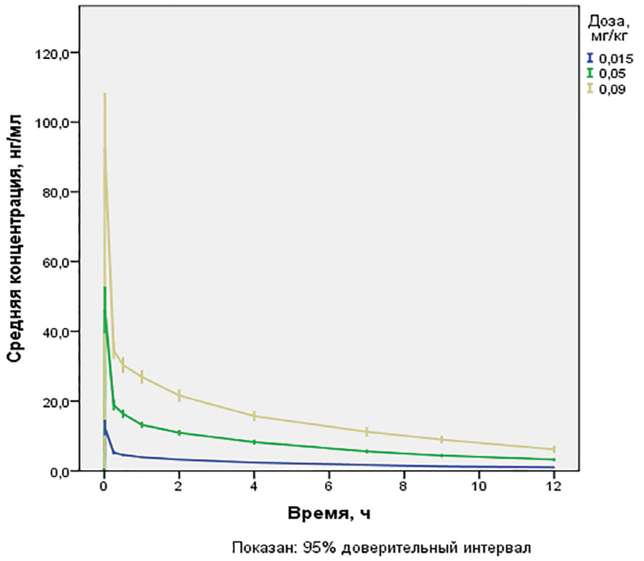


Рис. 1. Средние фармакокинетические кривые при введении трёх доз препарата Ангипур
Fig. 1. Average pharmacokinetic curves with the introduction of three doses of the drug Angipur

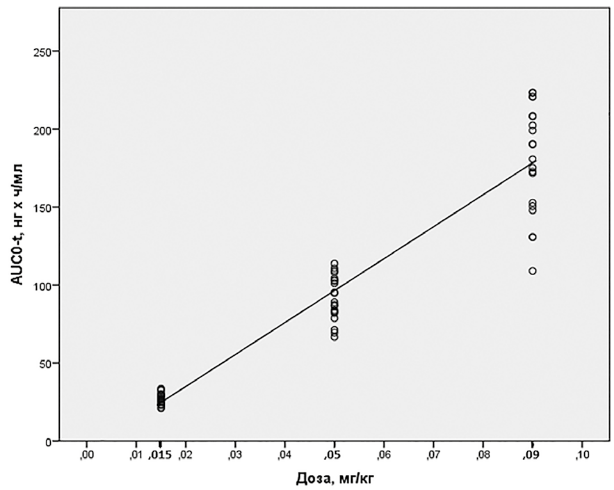


Рис. 2. Зависимость AUC_{0-t} от введённой дозы препарата Ангипур
Fig. 2. Dependence of AUC_{0-t} on the administered dose of Angipur

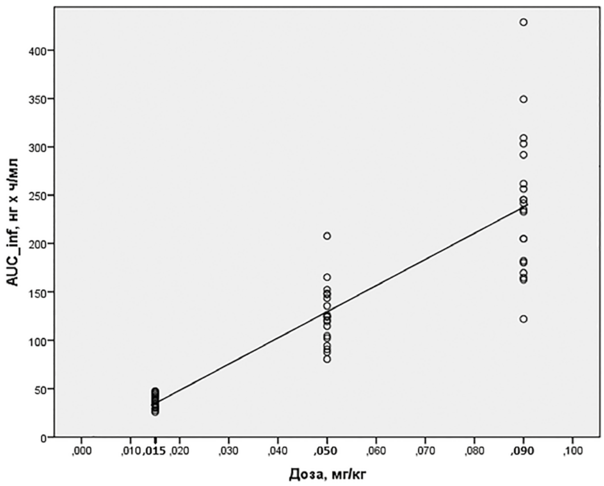


Рис. 3. Зависимость $AUC_{0-\infty}$ (AUC_{inf}) от введённой дозы препарата Ангипур
Fig. 3. Dependence of $AUC_{0-\infty}$ (AUC_{inf}) on the administered dose of the drug Angipur

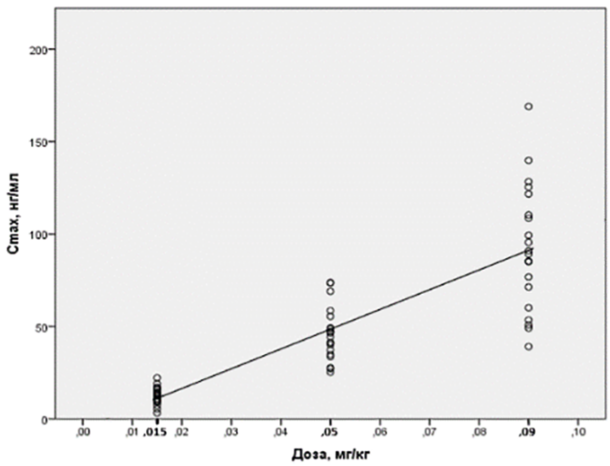


Рис. 4. Зависимость C_{max} от введённой дозы препарата Ангипур
Fig. 4. Dependence of C_{max} on the administered dose of Angipur

выходил за пределы критической области (0,876; 1,124), заключение о пропорциональной зависимости от дозы этого ФК параметра не могло быть сделано с помощью критерия Смита. Тогда, рассчитанный 90 % доверительный интервал для *b* также сравнили с критической областью на основе расширенных критических границ $Q_L = 0{,}5$ и $Q_H = 2{,}0$ – (0,613; 1,378) (Hummel criteria), что позволило сделать вывод о пропорциональной зависимости от дозы и для параметра C_{max}.

При дополнительном анализе для нормированных на дозу значений параметров C_{max} и AUC_{0-t} с помощью модели ANOVA для логарифмически преобразованных данных с дозовым уровнем в качестве фактора были определены точечные оценки и 90 % доверительные интервалы для отношения геометрических средних для разных уровней доз. На модели ANOVA не удалось выявить значимых различий между средними значениями нормированных на дозу значений параметров C_{max} и AUC_{0-t} после логарифмического преобразования ни для какого из трёх дозовых уровней. При этом доверительные интервалы для отношения геометрических средних значений лежали в пределах критерия Смита для AUC_{0-t} и расширенного критерия Hummel для C_{max}. Таким образом, статистические выводы о пропорциональной зависимости этих ФК параметров от введённой дозы, сделанные с помощью модели степенной функции, были дополнительно подтверждены.

Обсуждение / Discussion

На основании результатов, полученных в ходе данного клинического исследования, была получена возможность впервые детально охарактеризовать ФК профиль препарата Ангипур, что необходимо для разработки режима дозирования в дальнейших фазах клинических исследований.

После однократного внутривенного введения доз 0,015; 0,05 и 0,09 мг/кг максимальная концентрация препарата в плазме крови отмечалась после окончания введения, через 15 минут она быстро снижалась с последующим медленным снижением в течение 12 часов, что согласовывалось с результатами, полученными ещё на доклиническом этапе. В исследованиях на животных максимальная концентрация препарата достигалась также к концу введения (через 15 мин), а затем биэкспоненциально снижалась, включала быструю первую фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации [20, 21].

По окончании введения препарата в изучаемых дозах 0,015; 0,05 и 0,09 мг/кг C_{max} составляла в среднем 12,4±4,7, 46,1±14,3 и 92,5±33,9 нг/мл, соответственно. Параметр площадь под кривой (AUC) был охарактеризован следующими значениями: AUC_{0-t} составляла в среднем 27,1±3,7, 92,0±14,4 и 180,4±34,4 нг×ч/мл, а $AUC_{0-\infty}$ — 37,0±6,7, 125,8±30,2 и 239,6±72,4 нг×ч/мл, соответственно. Анализ данных ФК параметров позволил выявить их прямую пропорциональную зависимость от величины дозы, т. е. линейность ФК в изученном диапазоне доз .

Полученные значения объёма распределения (V_d) препарата Ангипур свидетельствовали об интенсивном характере распределения препарата в ткани и биологические жидкости организма — V_d составлял не менее 250 л во всех изученных дозах. В свою очередь период полувыведения составил около 6,5 часов, а общий клиренс (Cl) — около 32 л/ч.

Анализ полученных результатов также позволил говорить о том, что по ФК профилю среди здоровых добровольцев препарат Ангипур близок по ряду показателей к другому антиагреганту — тирофибану, который также относится к низкомолекулярным миметическим ингибиторам ГП IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов. Однако исследуемый препарат имел всё же несколько больший объём распределения и период полувыведения по сравнению с тирофибаном [32].

Завершая обсуждение результатов проведённого исследования, важно отметить, что данные по ФК препарата Ангипур у человека позволили разработать дизайн последующего клинического исследования II фазы в популяции пациентов с острым коронарным синдромом, которое продолжается в настоящее время [33].

Заключение / Conclusion

Результаты проведённого клинического исследования применения препарата Ангипур (0,02 % концентрат для приготовления раствора для инфузий) в однократных последовательных дозах 0,015, 0,05 и 0,09 мг/кг на здоровых добровольцах позволили определить основные ФК параметры препарата и выявить линейность его ФК.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Глухов Ю. Ф., Лукьянов С. В. являются сотрудниками ООО «Компания «ЭЛТА». Остальные авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье. Исследование проведено при финансовой поддержке ООО «Компания «ЭЛТА».

Conflict of interests. Glukhov YuF, Lukyanov SV are employees of LLC ELTA Company. The remaining authors declare that there is no potential conflict of interest requiring disclosure in this article. The study was conducted with the financial support of LLC ELTA Company.

Участие авторов. Фитилёв С. Б. — главный исследователь, финальное утверждение рукописи; Глухов Ю. Ф. — разработка концепции работы; Лукьянов С. В. — разработка концепции работы, написание протокола клинического исследования, написание текста рукописи; Казей В. И. — руководитель биоаналитической части исследования; Бондарева И. Б. — статистический анализ; Возжаев А. В. — со-исследователь, написание текста рукописи; Шкребнёва И. И. — со-исследователь, редактирование текста рукописи; Клюев Д. А. — со-исследователь, анализ данных литературы, редактирование текста рукописи.

Participation of authors. Fitilev SB — chief researcher, final approval of the manuscript; Glukhov YuF — development of the concept of work; Lukyanov SV — development of the concept of work, writing the protocol of clinical research, writing the text of the manuscript; Kazey VI — head of the bioanalytical part of the study; Bondareva IB — statistical analysis; Vozzhaev AV — co-researcher, writing the text of the manuscript; Shkrebneva II — co-researcher, editing the text of the manuscript; Kliuev DA — co-researcher, analysis of literary data, editing the text of the manuscript.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Фитилёв Сергей Борисович
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8395-419X
SPIN-код: 8287-8456
д. м. н., профессор, кафедра общей и клинической фармакологии, Медицинский институт, ФГАОУ ВО РУДН, Москва, Россия

Fitilev Sergey B.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8395-419X
SPIN code: 8287-8456
Dr. Sci. (Med.), professor, Department of General and Clinical Pharmacology, Medical Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Глухов Юрий Фёдорович
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1266-6040
генеральный директор, ООО «Компания «ЭЛТА», Москва, Россия

Glukhov Yuri F.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1266-6040
General Director, LLC ELTA Company, Moscow, Russia

Лукьянов Сергей Викторович
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-6004-5791
д. м. н., зам. генерального директора по медико-фармацевтическим разработкам, ООО «Компания «ЭЛТА», Москва, Россия

Lukyanov Sergei V.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-6004-5791
Dr. Sci. (Med.), deputy General Director for Medical and Pharmaceutical Development, LLC ELTA Company, Moscow, Russia

Казей Василий Игоревич
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2032-6289
SPIN-код: 6253-0211
к. б. н., генеральный директор, ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Россия

Kazey Vasily I.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2032-6289
SPIN code: 6253-0211
PhD, Cand. Sci. (Biology), General Director, LLC Exacte Labs, Moscow, Russia

Бондарева Ирина Борисовна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8436-8931
SPIN-код: 1631-3470
д. б. н., профессор, кафедра общей и клинической фармакологии РУДН, Москва, Россия

Bondareva Irina B.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8436-8931
SPIN code: 1631-3470
Dr. Sci. Biological, professor, Department of General and Clinical Pharmacology, Medical Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Возжаев Александр Владимирович
Автор, ответственный за переписку
e-mail: alex.vozzhaev@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2687-5986
SPIN-код: 8637-8963
д. фарм. н., доцент, кафедра общей и клинической фармакологии, Медицинский институт, ФГАОУ ВО РУДН, Москва, Россия

Vozzhaev Alexander V.
Corresponding author
e-mail: alex.vozzhaev@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2687-5986
SPIN code: 8637-8963
Dr. Sci. (Pharm.), associate professor, Department of General and Clinical Pharmacology, Medical Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Шкребнёва Ирина Ивановна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0070-3115
SPIN-код: 1105-5760
доцент, кафедра общей и клинической фармакологии, Медицинский институт, ФГАОУ ВО РУДН, Москва, Россия

Shkrebniova Irina I.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0070-3115
SPIN code: 1105-5760
associate professor, Department of General and Clinical Pharmacology, Medical Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Клюев Дмитрий Алексеевич
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2400-3938
SPIN-код: 8960-7798
аспирант, кафедра общей и клинической фармакологии, Медицинский институт, ФГАОУ ВО РУДН, Москва, Россия

Kliuev Dmitry A.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2400-3938
SPIN code: 8960-7798
post-graduate student, Department of General and Clinical Pharmacology, Medical Institute, RUDN University, Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Michelson AD. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Feb;9(2):154–169. DOI: 10.1038/nrd2957.

2. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MLEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteriesEndorsed by: the European Stroke Organization (ESO)The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2018 Mar 1;39(9):763–816. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx095.

3. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2016 Aug 1;37(29):2315–2381. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw106.

4. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233–241.

5. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115–126. DOI: 10.1056/NEJM199901143400207

6. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317–325. DOI: 10.1038/nature10146

7. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2016;50(5):e1-e88. DOI: 10.1093/ejcts/ezw313

8. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2016;37(3):267–315. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv320

9. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119–177. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx393

10. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2018 Jan 1;53(1):34–78. DOI: 10.1093/ejcts/ezx334.

11. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*. 2004;104(6):1606–1615. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1257.

12. Harrington RA, Kleiman NS, Kottke-Marchant K, Lincoff AM, Tcheng JE, Sigmon KN, et al. Immediate and reversible platelet inhibition after intravenous administration of a peptide glycoprotein IIb/IIIa inhibitor during percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 1995;76(17):1222–1227. DOI: 10.1016/s0002-9149(99)80345-2

13. Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Salyers AK, Taite BB, King LW, Miyano M, et al. *In vitro* and *in vivo* effects of a peptide mimetic (SC-47643) of RGD as an antiplatelet and antithrombotic agent. *Thromb Res*. 1991;62(5):567–578. DOI: 10.1016/0049-3848(91)90029-v

14. Peerlinck K, De Lepeleire I, Goldberg M, Farrell D, Barrett J, Hand E, et al. MK-383 (L-700,462), a selective nonpeptide platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, is active in man. *Circulation*. 1993;88(4 Pt 1):1512–1517. DOI: 10.1161/01.cir.88.4.1512

15. Théroux P, Kouz S, Roy L, Knudtson ML, Diodati JG, Marquis JF, et al. Platelet membrane receptor glycoprotein IIb/IIIa antagonism in unstable angina: The Canadian lamifiban study. *Circulation*. 1996;94(5):899–905. DOI: 10.1161/01.cir.94.5.899

16. Терещенко А.С., Меркулов Е.В., Самко А.Н. Применение ингибиторов гликопротеиновых IIb/IIIa рецепторов у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST и первичным чрескожным коронарным вмешательством. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. 2019;15(6):918–927. [Tereshchenko AS, Merkulov EV, Samko AN. Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Inhibitors in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction and Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2019;15(6):918–927. (In Russ).]. DOI: 10.20996/1819-6446-2019-15-6-918-927

17. Tscharre M, Michelson AD, Gremmel T. Novel Antiplatelet Agents in Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2020;25(3):191–200. DOI: 10.1177/1074248419899314.

18. Valgimigli M, Tebaldi M. Safety evaluation of tirofiban. *Expert Opin Drug Saf*. 2010;9(5):801–819. DOI: 10.1517/14740338.2010.507189.

19. King S, Short M, Harmon C. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: The resurgence of tirofiban. *Vascul Pharmacol*. 2016;78:10–16. DOI: 10.1016/j.vph.2015.07.008.

20. Смирнова Л.А., Спасов А.А., Халиуллин Ф.А., Кучерявенко А.Ф., Рябуха А.Ф., Абрамов О.К. Биофармацевтическое исследование инъекционной лекарственной формы нового антиагрегантного вещества 3-метил-8-(пиперазин-1-ил)-7-(тиетан-3-ил)-1-этил-1Н-пурин-2,6(3Н,7Н)-диона гидрохлорида. Химико-фармацевтический журнал. 2021;55(1):16-18. [Smirnova LA, Spasov AA, Khaliullin FA, Kucheryavenko AF, Ryabukha AF, Abramov OK. Biopharmaceutical study of an injectable dosage form of the new antiaggregant substance 3-methyl-8-(piperazin-1-yl)-7-(thietan-3-yl)-1-ethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione hydrochloride. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2021;55(1):14–16. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-1-16-18.

21. Смирнова Л.А., Рябуха А.Ф., Абрамов О.К., Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Халиуллин Ф.А. Количественное определение субстанции ангипур в плазме крови методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией. Химико-фармацевтический журнал. 2021;55(2):60–64. [Smirnova LA, Ryabukha AF, Abramov OK, Kucheryavenko AF, Spasov AA, Khaliullin FA. Quantitative determination of angipur substance in plasma by HPLC with fluorescence detection. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2021;55(2):60–64. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-2-60-64.

22. Руководства и методические рекомендации. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. Часть 1 / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013. 244 с. [Rukovodstva i metodicheskie rekomendacii. Rukovodstvo po provedeniyu klinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv. CHast' pervaya / Ed by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K, 2013. (In Russ).].

23. Миронов А.Н., Петров В.И., Меркулов В.А., Бупятян Н Д., Сакаева И.В., Кукес В.Г., и др. НТП. Руководства и методические рекомендации. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К, 2019. 328 с. [Mironov AN, Petrov VI, Merkulov VA, Bupyatyan ND, Sakaeva IV, Kukes VG, et al. NTP. Rukovodstva i metodicheskie rekomendacii. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennyh sredstv. Tom I. Moscow: Grif i K, 2019. (In Russ).].

24. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on bioanalytical method validation [Интернет]. London: European Medicines Agency; 2012 [цитируется по 21 январь 2022 г.]. 23 с. URL:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

25. НТП. Руководства и методические рекомендации. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть 2 / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013. 212 с. [NTP. Rukovodstva i metodicheskie rekomendacii. Rukovodstvo po provedeniyu klinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv (immunobiologicheskie lekarstvennye preparaty). CHast' vtoraya /Ed by A.N. Mironova. Moscow: Grif i K, 2013. (In Russ).].

26. Миронов А.Н., Меркулов В.А., Бупятян Н Д., Сакаева И.В., Кукес В.Г., Медуницын Н.В., и др. НТП. Руководства и методические рекомендации. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том II. М.: Гриф и К, 2019. 280 с. [Mironov AN, Merkulov VA, Bupyatyan ND, Sakaeva IV, Kukes VG, Medunitsyn NV, et al. NTP. Rukovodstva i metodicheskie rekomendacii. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennyh sredstv. Tom II. Moscow: Grif i K, 2019. (In Russ).].

27. Миронов А.Н., Меркулов В.А., Бупятян Н Д., Сакаева И.В., Кукес В.Г., Медуницын Н.В., и др. НТП. Руководства и методические рекомендации. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014. 344 с. [Mironov AN, Merkulov VA, Bupyatyan ND, Sakaeva IV, Kukes VG, Medunitsyn NV, et al. NTP. Rukovodstva i metodicheskie rekomendacii. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennyh sredstv. Tom III. Moscow: POLIGRAF-PLYUS, 2014. (In Russ).].

28. Миронов А.Н., Меркулов В.А., Сакаева И.В., Кукес В.Г., Медуниибн Н.В., Лепахин В.К., и др. НТП. Руководства и методические рекомендации. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том IV. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014. 172 с. [Mironov AN, Merkulov VA, Sakaeva IV, Kukes VG, Meduniyin NV, Lepakhin VK, et al. NTP. Rukovodstva i metodicheskie rekomendacii. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennyh sredstv. Tom IV. Moscow: POLIGRAF-PLYUS, 2014. (In Russ).].

29. Белоусов Ю.Б., Гуревич К.Г. Общая и частная клиническая фармакокинетика. Москва: ООО «Информационно-издательское агентство «Ремедиум»; 2006. 807 с. [Belousov YuB, Gurevich KG. Obshchaya i chastnaya klinicheskaya farmakokinetika. Moscow: OOO «Informacionno-izdatel'skoe agentstvo «Remedium». 2006. (In Russ).].

30. Smith BP, Vandenhende FR, DeSante KA, Farid NA, Welch PA, Callaghan JT, et al. Confidence interval criteria for assessment of dose proportionality. *Pharm Res*. 2000;17(10):1278–1283. DOI: 10.1023/a:1026451721686

31. Hummel J, McKendrick S, Brindley C, French R. Exploratory assessment of dose proportionality: review of current approaches and proposal for a practical criterion. *Pharm Stat*. 2009;8(1):38–49. DOI: 10.1002/pst.326

32. Kondo K, Umemura K. Clinical pharmacokinetics of tirofiban, a nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist: comparison with the monoclonal antibody abciximab. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(3):187–195. DOI: 10.2165/00003088-200241030-00003

33. № 02/19-ELTA «Многоцентровое рандомизированное простое слепое клиническое исследование режима дозирования, эффективности и безопасности препарата Ангипур (концентрат для приготовления раствора для инфузий 0,02 %) в сравнении с препаратом эптифибатид (раствор для внутривенного введения) у больных с острым коронарным синдромом с подъёмом сегмента ST ЭКГ при чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластике высокого риска со стентированием» [Интернет]. Госреестр лекарственных средств. 2021 [цитируется по 12 август 2021 г.]. [№ 02/19-ELTA «Mnogocentrovoe randomizirovannoe prostoe slepoe klinicheskoe issledovanie rezhima dozirovaniya, effektivnosti i bezopasnosti preparata Angipur (koncentrat dlya prigotovleniya rastvora dlya infuzij 0,02 %) v sravnenii s preparatom eptifibatid (rastvor dlya vnutrivennogo vvedeniya) u bol'nyh s ostrym koronarnym sindromom s pod"yomom segmenta ST EKG pri chreskozhnoj translyuminal'noj koronarnoj angioplastike vysokogo riska so stentirovaniem». [Internet]. (In Russ).]. URL: https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CIStatementGUID=762c3c7b-5576-4f01-a0ae-bee787d76d05&CIPermGUID=8E940830-13CC-43F7-8310-BF3CD867D20F

Сравнительное изучение фармакокинетики и энзиматической устойчивости нейропротекторного средства ГЗК-111 и ноопепта у крыс

Бойко С. С., Колясникова К. Н., Жердев В. П.

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

Аннотация. В статье представлены результаты изучения фармакокинетики и энзиматической устойчивости нового фармакологически активного соединения ГЗК-111 — этилового эфира *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролина в сравнении с ноопептом — этиловым эфиром *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицина у крыс. Показано, что оба соединения интенсивно метаболизируются в организме экспериментальных животных, при этом одним из основных активных метаболитов у обоих соединений является цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ), обладающий аналогичной нейротропной активностью, но интенсивность и скорость его образования в процессе метаболических превращений значительно более выражена у ГЗК-111 по сравнению с ноопептом. Показано значение фармакокинетики ЦПГ в реализации основных нейротропных эффектов изучаемых соединений в эксперименте у крыс.

Ключевые слова: фармакокинетика; метаболизм; ГЗК-111; ноопепт; цикло-L-пролил-глицин (ЦПГ)

Для цитирования:
Бойко С. С., Колясникова К. Н., Жердев В. П. Сравнительное изучение фармакокинетики и энзиматической устойчивости нейропротекторного средства ГЗК-111 и ноопепта у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(3):20–25. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-20-25
Поступила: 27 июня 2022 г. **Принята:** 03 июля 2022 г. **Опубликована:** 24 августа 2022 г.

Comparative study of pharmacokinetics and enzymatic resistance of the neuroprotective mean GZK-111 and noopept in rats

Boyko SS, Kolyasnikova KN, Zherdev VP

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The article presents the results of studying the pharmacokinetics and enzymatic stability of a new pharmacologically active compound GZK-111 – N-phenylacetyl-glycyl-L-proline ethyl ether in comparison with noopept – N-phenylacetyl-L-prolyl-glycine ethyl ether in rats. It has been shown that both compounds are intensively metabolized in the body of experimental animals, while one of the main active metabolites of both compounds is cyclo-L-prolylglycine (CPG), which has similar neurotropic activity, but the intensity and speed of its formation during metabolic transformations is significantly more pronounced in GZK-111 compared to noopept. The significance of CPG in the realization of the main neurotropic effects of the studied compounds in the experiment in rats is shown.

Keywords: pharmacokinetics; metabolism; GZK-111; noopept; cyclo-L-prolylglycine (CPG)

For citations:
Boyko SS, Kolyasnikova KN, Zherdev VP. Comparative study of pharmacokinetics and enzymatic resistance of the neuroprotective mean GZK-111 and noopept in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(3):20–25. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-20-25
Received: June 27, 2022. **Accepted:** July 03, 2022. **Published:** August 24, 2022

Введение / Introduction

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» разрабатывается новое нейропротекторное средство с анксиолитическим компонентом действия, соединение ГЗК-111, представляющее собой этиловый эфир *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролина, отличающийся от ноопепта – этилового эфира *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицина – последовательностью аминокислот. Ранее было высказано предположение, что антиамнестическая активность замещённых Gly-Pro и Pro-Gly дипептидов происходит благодаря их метаболизму до ЦПГ [1, 2]. И действительно, при изучении фармакокинетики ноопепта в эксперименте у крыс было показано образование ЦПГ в качестве его основного активного метаболита, структура которого была идентифицирована со стандартом-свидетелем методом ВЭЖХ—масс-спектрометрии [3—6]. При изучении фармакологической активности ноопепта было показано, что он обладает ноотропной и нейропротекторной активностью в дозах 0,1—2 мг/кг при внутрибрюшинном введении и сохраняет активность при внутрижелудочном введении в дозе 1—10 мг/кг [7]. Позднее, при изучении фармакологической активности ГЗК-111 было показано, что он обладает, также как ноопепт, нейропротекторной и ноотропной активностью, при этом нейротропные эффекты ГЗК-111 проявлялись в дозах 0,1—3,0 мг/кг при внутрибрюшинном введении [8] и сохранялись при пероральном введении в интервале доз 10—40 мг/кг [9]. Кроме того, было также показано образование ЦПГ в качестве основного активного метаболита ГЗК-111 [10, 11]. Ранее при изучении фармакологической активности ЦПГ было установлено наличие у него комплекса нейротропных эффектов, аналогичных ГЗК-111 и ноопепту, которые проявлялись в дозах 0,05—1,0 мг/кг при внутрибрюшинном введении [8], сохранялись при пероральном введении, при этом эффективные дозы ЦПГ были меньше эффективных доз как ГЗК-111, так и ноопепта [7—9]. В связи с вышеизложенным, было сделано предположение, что различия в эффективных дозах изучаемых соединений связаны с фармакокинетикой и метаболической устойчивостью ГЗК-111 и ноопепта, а также фармакокинетическими характеристиками образующегося активного метаболита ЦПГ.

Целью данной работы было сравнительное изучение фармакокинетики и энзиматической устойчивости ГЗК-111 и ноопепта, а также их активного метаболита ЦПГ в эксперименте у крыс.

Материалы и методы / Materials and methods

Субстанции ноопепта, ГЗК-111 (т. пл. 111–112 °С, –88° (с1, CH_3OH)) и ЦПГ (т. пл. 203–206 °С (из спирта), $[\alpha]^{22}_D$ –192° (с1, вода)) были синтезированы в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Исследования фармакокинетики ноопепта и его метаболита ЦПГ в плазме крови крыс проведены на белых беспородных крысах-самцах, массой 200–250 г, после внутрижелудочного введения водного раствора субстанции ноопепта в дозе 50 мг/кг с использованием метода ВЭЖХ [3, 4]. Идентификацию и количественное определение ЦПГ проводили методом ВЭЖХ масс-спектрометрии как описано ранее [5, 6]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-теста Стьюдента. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения и средней ошибки определения (M±m). Расчёт фармакокинетических параметров проводили модельно-независимым методом (M-ind). Изучение фармакологической активности проводили методами, описанными в ранее опубликованных работах [7–9]. Количественное определение неизмененённого ГЗК-111 и его метаболита ЦПГ проводили методом ВЭЖХ масс-спектрометрии после внутрижелудочного введения субстанции ГЗК-111 в крахмальной взвеси в дозе 20 мг/кг [10, 11]. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили так же, как указано для ноопепта. Расчёт фармакокинетических параметров проводили модельно-независимым методом (M-ind) на основе фармакокинетических кривых, построенных по усреднённым экспериментальным данным (n = 5). Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. Животных содержали в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP) и нормативным документом «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев», утверждённым Главным Государственным санитарным врачом 06.04.1973 г. №1045-73 и Приказом МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Эксперименты проводили с 10 до 16 часов. Изучение фармакокинетики ноопепта, ГЗК-111 и их метаболита ЦПГ проводили в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [12].

Результаты и обсуждение / Results and discussion

При сравнительном изучении фармакокинетики ГЗК-111 и ноопепта было показано, что они подвергаются интенсивной биотрансформации в плазме крови крыс и вследствие эффекта «первого прохождения через печень», более выраженной у ГЗК-111 по сравнению с ноопептом [3, 4, 10, 11]. Два продукта метаболизма обоих соединений совпадают по структуре, идентифицированы со стандартами-свидетелями обнаруженных метаболитов: это фенилуксусная кислота и цикло-*L*-пролил-глицин, образование которых в большей степени выражено в процессе метаболизма ГЗК-111 по сравнению с ноопептом [3, 4, 10, 11]. Для фенилуксусной кислоты нейротропная активность не изучалась, но показана противоопухолевая активность [4]. Кроме того, фенилуксусная кислота и ЦПГ обнаружены в качестве эндогенных соединений в плазме и мозге крыс [3–6]. Было установлено, что ЦПГ проявляет нейротропную активность, аналогичную ГЗК-111 и ноопепту, в значительно меньших дозах [9–11]. В то же время ЦПГ, как пептидное соединение циклической структуры, более устойчиво к энзиматическому воздействию [13] по сравнению с ноопептом и ГЗК-111. Эти соединения являются эфирными производными замещённых дипептидов, подвергаются интенсивной биотрансформации под воздействием эстераз и пептидаз плазмы крови крыс с образованием промежуточного продукта метаболизма Pro-Gly-OEt или Gly-Pro-OEt, соответственно, и их последующей циклизацией до ЦПГ. Образование ЦПГ как метаболита ноопепта и ГЗК-111, помимо экспериментов *in vivo*, показано также в опытах *in vitro* при инкубации изучаемых соединений с плазмой крови крыс [14, 15]. Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что различия эффективных доз ЦПГ, ГЗК-111 и ноопепта связаны с фармакокинетикой сравниваемых соединений, их энзиматической устойчивостью и биодоступностью для ЦНС.

На рис. 1 представлены предполагаемые схемы метаболизма ноопепта и ГЗК-111 с образованием циклического дипептида ЦПГ.

На рис. 1 представлены структурные формулы ноопепта, ГЗК-111 и предполагаемый процесс образования их активного метаболита ЦПГ. В результате отщепления этилового эфира и фенилацетильного фрагмента от молекулы замещённого дипептида как ноопепта, так и ГЗК-111 происходит образование промежуточного продукта с его последующей циклизацией до ЦПГ. При изучении фармакологической активности ГЗК-111, ноопепта и ЦПГ было показано, что спектр фармакологических эффектов аналогичен для всех трёх соединений, но эффективные дозы для ЦПГ меньше, чем в случае ГЗК-111 и, особенно, ноопепта. Учитывая этот факт, а также различия физико-химических свойств сравниваемых соединений, было сделано предположение, что изучаемые вещества могут

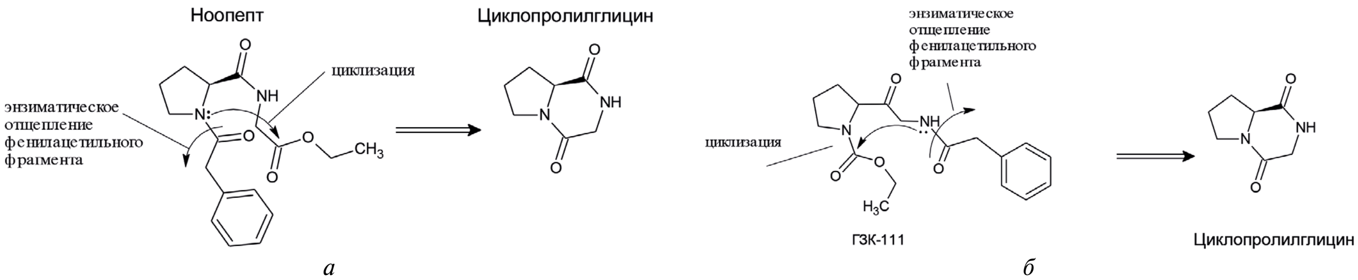


Рис. 1. Образование ЦПГ в процессе метаболизма изучаемых соединений

Fig. 1. Formation of CPG in the process of metabolism of the studied compounds

а — метаболизм ноопепта; *б* — метаболизм соединения ГЗК-111.

a — metabolism of noopept, enzymatic cleavage of the phenylacetyl fragment, cyclization; *б* — metabolism of the compound GZK-111, enzymatic cleavage of the phenylacetyl fragment, cyclization

отличаться по фармакокинетике и энзиматической устойчивости. И действительно, при сравнительном изучении фармакокинетики ГЗК-111 и ноопепта после внутрижелудочного введения, а также их метаболита ЦПГ были установлены существенные различия их фармакокинетических параметров. В табл. 1 и 2 представлены фармакокинетические параметры ноопепта, ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови крыс после внутрижелудочного введения изучаемых веществ.

Изучение фармакокинетики ноопепта и ГЗК-111 было проведено после внутрижелудочного введения в разных дозах и разной форме (ноопепт в виде водного раствора, соединение ГЗК-111 — в 1 % крахмальной взвеси) и полученные результаты свидетельствуют о значительно более выраженном метаболизме с образованием ЦПГ у ГЗК-111. Кроме того, нет данных о зависимости фармакокинетики и метаболизма этих соединений от дозы, поэтому для интерпретации полученных результатов были использованы не только абсолютные значения дозозависимых параметров (максимальные концентрации и площади под фармакокинетическими кривыми), но их коэффициенты превращения в ЦПГ и поступления в системный кровоток (соотношения ЦПГ/ноопепт и ЦПГ/ГЗК-111). Эти соотношения позволили дать объективную оценку установленных различий дозозависимых параметров ноопепта и ГЗК-111, которые представлены в табл. 3.

Таблица 1

Фармакокинетические параметры ноопепта и ЦПГ в плазме крови крыс после внутрижелудочного введения водного раствора ноопепта в дозе 50 мг/кг

Table 1

Pharmacokinetic parameters of noopept and CPG in rat blood plasma after intragastric administration of an aqueous solution of noopept at a dose of 50 mg/kg. metabolism of the compound GZK-111

Параметры	Ноопепт	ЦПГ
C_{max}, нг/мл	290,00±23,00	380,00±40,00
T_{max}, ч	0,15±0,07	0,45± 0,08
AUC_{0-t}, нг/мл/ч	135,00±13,00	312,00±26,00
K_{el}, ч$^{-1}$	3,844±0,350	0,345±0,03
$T_{1/2}$, ч	0,18 ± 0,10	1,99±0,97
MRT, ч	0,33±0,10	2,18±0,18
V_d/F, л	38,75±0,45	–

Примечания: C_{max}, нг/мл – максимальная концентрация изучаемых соединений в плазме крови крыс; T_{max}, ч – время достижения максимальной концентрации в плазме крови крыс; AUC_{0-t}, нг/мл/ч – площадь под фармакокинетической кривой; $T_{1/2}$, ч – период полувыведения; MRT, ч – среднее время существования изучаемых соединений в неизменённом виде; V_d/F, л – объём распределения в организме.

Notes: C_{max}, ng/ml is the maximum concentration of the studied compounds in rat blood plasma; T_{max}, h is the time to reach the maximum concentration in rat blood plasma; AUC_{0-t}, ng/ml/h is the area under the pharmacokinetic curve; $T_{1/2}$, h is the half-life; MRT, h is the average time of existence the studied compounds in unchanged form; V_d/F, l – the volume of distribution in the body.

При сравнении фармакинетических параметров изучаемых соединений после их внутрижелудочного введения отмечались различия на всех стадиях процессов фармакокинетики, которые в большей степени были выражены для дозозависимых параметров — максимальных концентраций и площадей под фармакокинетическими кривыми этих соединений, а также для их соотношений (коэффициентов), которые характеризуют скорость и степень их метаболизма до ЦПГ и поступления в системный кровоток.

Так, на стадии абсорбции отмечены значительные различия скорости всасывания ГЗК-111 и ноопепта и их поступления в системный кровоток: величина C_{max} соединения ГЗК-111 значительно меньше, чем у ноопепта вследствие более интенсивного метаболизма ГЗК-111 до ЦПГ по сравнению с ноопептом, на что указывают различия коэффициентов C_{max} ЦПГ / C_{max} ноопепт, равный 1,32, в то время как для соединения ГЗК-111 отношение C_{max} ЦПГ / C_{max} ГЗК-111 составляет 77,22.

Второй коэффициент (см. табл. 3), который характеризует степень образования ЦПГ из обоих соединений по сопоставлению площадей AUC ЦПГ / ГЗК-111 и AUC ЦПГ/ноопепт, эта величина многократно выше у ГЗК-111 и составляет 364,2, в то время как для ноопепта она равна 2,18. Степень превращения ГЗК-111 в ЦПГ более чем в 100 раз выше, чем это характерно для ноопепта. Может быть, это, наряду со скоростью

Таблица 2

Фармакокинетические параметры соединения ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови крыс после внутрижелудочного введения соединения ГЗК-111 в крахмальной взвеси в дозе 20 мг/кг (данные предоставлены *Литвиным А.А. и др.* [10] и *Колывановым Г.Б. и др.* [11])

Table 2

Pharmacokinetic parameters of the compound GZK-111 and CPG in rat blood plasma after intragastric administration of the compound GZK-111 in starch suspension at a dose of 20 mg/kg (data provided by *Litvin AA, et al.* [10], *Kolyvanov GB, et al* [11])

Параметры	ГЗК-111	ЦПГ
C_{max}, нг/мл	0,18	13,90
T_{max}, ч	0,25	2,0
AUC_{0-t}, нг/мл/ч	0,100	36,42
K_{el}, ч$^{-1}$	1,252	0,50
$T_{1/2}$, ч	0,43	1,38
MRT, ч	0,67	2,43
V_d F, л	95,10	–

Примечание: обозначения параметров как в табл. 1, вместо ноопепта – соединение ГЗК-111.
Note: the parameter designations are as in table 1, instead of noopept – the compound GZK-11.

Таблица 3

Коэффициенты скорости и степени поступления в системный кровоток изучаемых веществ и их метаболита ЦПГ после внутрижелудочного введения ноопепта и ГЗК-111

Table 3

Coefficients of the rate and degree of entry into the systemic circulation of the studied substances and their metabolite CPG after intragastric administration of noopept and GZK-111

Номера параметров	Коэффициенты дозозависимых параметров ноопепта	Коэффициенты дозозависимых параметров ГЗК-111
1. Скорость образования и поступления в системный кровоток ЦПГ из изучаемых соединений	C_{max} ЦПГ / C_{max} ноопепта 380,00 : 290,00 = 1,32	C_{max} ЦПГ / C_{max} ГЗК-111 13,90 : 0,18 = 77,22
2. Степень образования ЦПГ из изучаемых соединений	AUC ЦПГ / AUC ноопепта 312,00 : 135,00 = 2,18	AUC ЦПГ / AUC ГЗК-111 36,41 : 0,100 = 364,2

Примечания: Отношение C_{max} ЦПГ / C_{max} ноопепта – коэффициент метаболизма ноопепта до ЦПГ и поступления в системный кровоток =1,32; отношение AUC ЦПГ /AUC ноопепта – степень превращения ноопепта в ЦПГ и поступления лекарственных веществ в системный кровоток =2,18; отношение C_{max} ЦПГ / C_{max} GZK-111 – коэффициент метаболизма до ЦПГ и поступления в системный кровоток =77,22; отношение площадей под фармакокинетическими кривыми соединения ГЗК-111 и ЦПГ AUC ЦПГ/AUC ГЗК-111 – степень превращения ГЗК-111 в ЦПГ и поступления ЦПГ в системный кровоток = 364,2.
Notes: The ratio C_{max} CPG / C_{max} noopept is the coefficient of metabolism of noopept to CPG and the entry of drugs into the systemic circulation =1.32; Ratio AUC of CPG / AUC of noopept – the degree of conversion of noopept into CPG and the entry of drugs into the systemic circulation =2.18; The ratio of the metabolic rate and intake into the systemic circulation of GZK-111 to CPG – C_{max} CPG / C_{max} GSK-111 =77.22; The ratio of the areas under the pharmacokinetic curves of the compound GZK-111 and CPG AUC CPG / AUC GZK-111 is the degree of conversion of GZK-111 into CPG and intake of CPG into the systemic circulation =364.2.

превращения сравниваемых соединений в ЦПГ, и является лимитирующей стадией в различии проявления фармакологической активности ноопепта и ГЗК-111, если предположить, что их активность обусловлена метаболитом ЦПГ.

Представленные в таблицах коэффициенты, полученные нами, подтверждают существовавшее ранее теоретическое предположение о том, что образование ЦПГ по имидной связи GLY-PRO происходит быстрее и легче, как это имеет место в случае с ГЗК-111, чем по амидной связи PRO-GLY у ноопепта, как это показано в данной работе. Следует отметить, что ЦПГ не является единственным метаболитом ГЗК-111, помимо него в высокой концентрации определяются ещё 2 метаболита: фенилацетилглицил-L-пролин и фенилуксусная кислота [11], фармакокинетика которых в данной работе не рассматривается.

Полученные результаты указывают на более продолжительное нахождение ЦПГ в системном кровотоке крыс по сравнению как с ноопептом, так и с ГЗК-111. Такие фармакокинетические параметры ЦПГ, как период полувыведения, который составляет 1,48 ч, и величина MRT, равная 2,43 ч, подтверждаются данными после непосредственного введения ЦПГ в системный кровоток крыс, при этом величина $T_{1/2}$ ЦПГ составляет 1,33 ч [16]. О биологической стабильности ЦПГ свидетельствует также более высокая величина его MRT по сравнению с аналогичным параметром ноопепта и ГЗК-111, что также указывает и на его более интенсивное распределение по органам и тканям крыс.

Полученные данные по метаболизму ноопепта и соединения ГЗК-111 до активного метаболита ЦПГ, различию эффективных доз сравниваемых веществ в сопоставлении с их нейротропными эффектами, а также эндогенная природа ЦПГ, подтверждают возможную роль ЦПГ в реализации эффектов ноопепта и соединения ГЗК-111. Эндогенное происхождение ЦПГ также показано в работе новозеландских учёных, которые установили, что ЦПГ образуется в результате последовательного энзиматического расщепления концевого трипептида – Gly-Pro-Glu инсулиноподобного фактора роста IGF-1, показана его нейропротекторная и ноотропная активность в экспериментальных и клинических исследованиях [17]. Благодаря структурной идентичности с эндогенным, образующийся ЦПГ имеет большое сродство к рецепторам, осуществляющим его нейротропные эффекты, аналогичные эффектам изучаемых соединений при введении в меньших дозах, и тем самым вносит существенный вклад в реализацию изучаемых эффектов ноопепта и соединения ГЗК-111.

Заключение / Conclusion

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что новое соединение ГЗК-111 имеет преимущество по сравнению с ноопептом по скорости и степени превращения в активный метаболит ЦПГ, который обладает комплексом нейрофармакологических эффектов, аналогичных соединению ГЗК-111 и принимает участие в реализации нейротропных эффектов соединения ГЗК-111. Таким образом, с учётом полученных данных по метаболизму ГЗК-111, высокой фармакологической активности метаболита ЦПГ, а также принимая во внимание эндогенное происхождение ЦПГ, соединение ГЗК-111 можно рассматривать как перспективное нейропротекторное средство, имеющее преимущество перед используемым в медицинской практике ноопептом.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Бойко Светлана Семёновна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: svboyko@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2177-2010
SPIN-код: 4176-8921
к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Boyko Svetlana S.
Corresponding author
e-mail: svboyko@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2177-2010
SPIN code: 4176-8921
PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Колясникова Ксения Николаевна
e-mail: kszolotova@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6797-692X
SPIN-код: 5682-2035
к. б. н., н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

Koliasnikova Ksenia N.
e-mail: kszolotova@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6797-692X
SPIN code: 5682-2035
PhD, Cand. Sci. (Biology), Research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Жердев Вдадимир 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. (Med.), professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Gudasheva TA, Voronina TA, Ostrovskaya RU, et al. Synthesis and antiamnesic activity of a series of N-acylprolyl-containing dipeptides. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 1996;31(2):151–157. DOI: 10.1016/0223-5234(96)80448-X

2. Патент РФ на изобретение № 2646604/ 06.03.18. Бюл. № 7. Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Кузнецова Е.А., Воронина Т.А., Яркова М.А., Антипова Т.А., Литвинова С.А., Золотов Н.Н. Новые глипролины с ноотропной, антигипоксической, нейропротективной и анксиолитической активностью. [Patent RUS №2646604/ 06.03.18. Byul. № 7. Seredenin SB, Gudasheva TA, Koliasnikova KN, Kuznetsova EA, Voronina TA, Yarkova MA, Antipova TA, Litvinova SA, Zolotov NN. Novyye gliproliny s nootropnoy, antigipoksicheskoy, neyroprotektivnoy i anksioliticheskoy aktivnost'yu (In Russ).]. URL: https://findpatent.ru/patent/264/2646604.html Ссылка активна на 14.06.2022.

3. Бойко С.С., Жердев В.П., Гудашева Т.А., Островская Р.У. и др. Фармакокинетика дипептидного аналога пирацетама с ноотропной активностью ГВС-111 и его основных метаболитов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 1997;60(2):53–55. [Boyko SS, Zherdev VP, Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, et al. Pharmacokinetics of dipeptide analog pyracetame wich nootropic activity GWS-111 and its main metabolites. *Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 1997;60(2):53–55. (In Russ).].

4. Бойко С.С., Жердев В.П., Коротков С.А., Гудашева Т.А., Островская Р.У. Фармакокинетика нового потенциального ноотропногоо дипептидного препарата ГВС-111 и его метаболитов в мозге крыс. *Химико-фармацевтический журнал.* 2001;35(9):11–13. [Boyko SS, Zherdev VP, Korotkov SA, Gudasheva TA, Ostrovskaya RU. Pharmacokinetics of a new potential nootropic dipeptide drug GVS-111 and its metabolites in the rat brain. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 2001;35(9):11–13. (In Russ).]. DOI: 10.1023/A^10140824082406443

5. Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, Ostrovskaya RU, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Lett.* 1996;391(1-2):149–152. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00722-3

6. Gudasheva TA, Boyko SS, Ostrovskaya RU, et al. The major metabolite of dipeptide piracetam analogue GVS-111 in rat brain and similarlity to endogenous neuropeptide cyclo-prolylglycine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1997;22(3):245–252. DOI: 10.1007/BF03189814

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

8. Koliasnikova KN, Povarnina PYu, Tallerova AV, et al. Glyproline Pro-Ampakine with neuroprotective activity. Neuroprotection – New Approaches and Prospects, Matilde Otero-Losada, Francisco Capani and Santiago Perez Lloret, IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.91192. URL: https://www.intechopen.com/chapters/71098

9. Колясникова К.Н., Поварнина П.Ю., Кузнецова Е.А. и др. Замещенный глипролин ГЗК-111 сохраняет антигипоксический и анксиолитический эффекты при пероральном введении. *Химико-фармацевтический журнал.* 2021;55(10):10–13. [Kolyasnikova KN, Povarnina PYu, Kuznetsova EA, et al. Substituted glyproline GZK-111 retains antihypoxic and anxiolytic activity upon oral administration. *Chemical and Pharmaceutical Journal.* 2021;55(10):10–13. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-10-10-13.

10. Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Бочков П.О. и др. Доклиническая фармакокинетика дипептида ГЗК-111 с нейропротективной активностью. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2021; 172(9):298–302. [Litvin AA, Kolyvanov GB, Bochkov PO, et al. Preclinical pharmacokinetics of dipeptide with neuroprotective activity GZK-111. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2021;172(9):298–302. (In Russ).]. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-9-298-30211

11. Колыванов Г.Б., Бочков П.О., Литвин А.А. и др. Метаболизм нового дипептидного нейропротектора ГЗК-111 у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2021;172(11):618–621. [Kolyvanov GB, Bochkov PO, Litvin AA, et al. Metabolism of a new dipeptide neuroprotector in rats. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2021;172(11):618–621. (In Russ).]. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-11-618-621

12. Миронов А.Н. 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 (2013). [Mironov AN. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Guidelines for conducting preclinical studies of the pharmacokinetics of new drugs, AN Mironov (gen. ed.), part 1, Moscow (2013). (In Russ).].

13. Prasad C. Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides.*1995;16(1):151–164. DOI: 10.101016/0196-9781(94)00017-z

14. Василевич Н.И. Синтез и оптимизация структур пролинсодержащих пептидных аналогов пирацетама: автореферат дис. ... канд. хим. наук. – Москва; 1996. [Vasilevich NI. Synthesis and optimization of structures of proline-containing peptide analogues of piracetam. Abstract of the candidate. [dissertation] Moscow; 1996. (In Russ).]. URL: http://www.dslib.net/bio-organika/sintez-i-optimizacija-struktur-prolinsoderzhawih-peptidnyh-analogov-piracetama.html. Ссылка активна на 14.06.2022.

15. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Кузнецова Е.А. и др. Этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина метаболизируется до цикло-L-пролилглицина, проявляя сходный спектр нейропсихотропной активности. *Химико-фармацевтический журнал,* 2016;50(11):3–8. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kuznetsova EA, et al. N-phenylacetyl-glycyl-L-proline ethyl ester converts into cyclo-L-prolyl-glycine showing a similar spectrum of neuropsychotropic activity. *Chemico-Pharmaceutical Journal.* 2016;50(11):3–8. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-11-3-8.

16. Ковалёв Г.И., Золотарёв Ю.А., Дадаян А.К., Шрам С.И., Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Колыванов Г.Б., Жердев В.П. Изучение фармакокинетики [3H]-циклопролилглицина в крови крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2018;(3):48–56. [Kovalev GI, Zolotarev YuA, Dadayan AK, Shram SI, Abdullina AA, Vasileva EV, Kolyvanov GB, Zherdev VP. The Study of [3H]-Cycloprolylglycine Pharmacokinetics in Rat Blood. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2018;(3):48–56. (In Russ).]. DOI: 10.24411/2587/7836-2018-10024

17. Guan J. Insulin-Like Growth Factor-1 and its Derivatives Potential Pharmaceutical Application for Ischemic Brain Injury. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2008;3(2):112–127. DOI: 10.2174/157488908784534630.

Активность 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиола (хлонизола) в сравнении с ломустином на модели интракраниально трансплантированных опухолей у мышей

Змитриченко Ю. Г., Стуков А. Н., Александров В. А., Точильников Г. В., Муразов Я. Г., Латипова Д. Х., Филатова Л. В., Семиглазова Т. Ю.

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. *Актуальность.* Алкилирующие препараты многие десятилетия используются в химиотерапии опухолей, и поиск эффективных соединений продолжается. *Цель* исследования изучить активность разрабатываемого нового соединения – 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиола (хлонизола) в сравнении с ломустином (CCNU) из близкой по химическому строению группы нитрозоалкилмочевины на модели интракраниально трансплантированных опухолей Эрлиха и саркомы 180 у мышей. *Методы.* 64 мышам самкам линии BALB/c, согласно разработанной методики, под наркозом делали прокол в черепе и инокулировали опухолевые клетки карциномы Эрлиха или саркомы 180 в 0,9 % растворе натрия хлорида. Через 24 ч вводили тестируемые вещества в максимально переносимых дозах – хлонизол (20 мг/кг, в/б) и ломустин (50 мг/кг, перорально), однократно. Эффект сравнивали с контролем (введение растворителя). *Результаты.* Хлонизол достоверно увеличивал медиану продолжительности жизни (МПД) животных-опухоленосителей после интракраниальной трансплантации как опухоли Эрлиха (на 39 %), так и саркомы 180 (на 84 %) по сравнению с контролем (p<0,0001). Хлонизол снижал риск гибели мышей на 73 % по отношению к контролю при трансплантации опухоли Эрлиха и на 83 % – при саркоме 180 (p<0,0001). В противоположность этому, ломустин не проявил достоверного терапевтического эффекта при интракраниальной трансплантации обоих опухолевых штаммов. *Заключение*. Высокая активность хлонизола в сравнении с ломустином даёт основание рассматривать его как потенциальный цитостатик при лечении опухолей нервной системы.

Ключевые слова: хлонизол; ломустин; интракраниальная транслантация опухоли; карцинома Эрлиха; саркома 180

Для цитирования:
Змитриченко Ю. Г., Стуков А. Н., Александров В. А., Точильников Г. В., Муразов Я. Г., Латипова Д. Х., Филатова Л. В., Семиглазова Т. Ю. КАктивность 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиола (хлонизола) в сравнении с ломустином на модели интракраниально трансплантированных опухолей у мышей. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(3):26–32. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-26-32
Поступила: 02 июля 2022 г. **Принята:** 16 июля 2022 г. **Опубликована:** 24 августа 2022 г.

Activity of 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propandyol (chlonisol) versus lomustine in intracranial transplanted tumor model in mice

Zmitrichenko IuG, Stukov AN, Alexandrov VA, Tochilnikov GV, Murazov IaG, Latipova DH, Filatova LV, Semiglazova TYu

NMRC of Oncology named after N.N.Petrov of MoH of Russia, St. Petersburg, Russia

Abstract. *Background.* Alkylating drugs have been used in tumor chemo therapy for many decades, and the search for effective compounds continues. *The aim* of the study was to study the activity of the developed new compound – 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol) in comparison with lomustine (CCNU) from the nitrosoalkylurea group, which is similar in chemical structure, in the model of intracranially transplanted Ehrlich's tumor and sarcoma 180 in mice. *Methods.* According to the developed technique, 64 female mice of the BALB/c line were punctured in the skull under anesthesia and inoculated with tumor cells of Ehrlich's carcinoma or sarcoma 180 in 0.9 % sodium chloride solution. After 24 hours, the test substances were administered at the maximum tolerated doses – chlonisol (20 mg/kg, i.p.) and lomustine (50 mg/kg, orally), once. The effect was compared with the control (solvent injection). *Results.* Chlonisol significantly increased the median overall survival (MOS) of animals after intracranial transplantation of both Ehrlich's tumor (by 39 %) and sarcoma 180 (by 84 %) compared with control (p<0.0001). Chlonisol reduced the risk of death in mice by 73 % compared to control in Ehrlich tumor transplantation and by 83 % in sarcoma 180 (p<0.0001). In contrast, lomustine did not show a significant therapeutic effect in intracranial transplantation of both tumors. *Conclusion.* The high activity of chlonisol in comparison with lomustine gives reason to consider it as a potential cytostatic agent in the treatment of nervous system tumors.

Keywords: chlonisol; lomustine; intracranial tumor transplantation; Ehrlich's carcinoma; sarcoma 180

For citations:
Zmitrichenko IuG, Stukov AN, Alexandrov VA, Tochilnikov GV, Murazov IaG, Latipova DH, Filatova LV, Semiglazova TYu. Activity of 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propandyol (chlonisol) versus lomustine in intracranial transplanted tumor model in mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(3):26–32. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-26-32
Received: July 02, 2022. **Accepted:** July 16, 2022. **Published:** August 24, 2022

Введение / Introduction

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в течение ряда лет изучается 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол (хлонизол) как новый потенциально активный противоопухолевый препарат [1–3]. Это соединение относится к группе алкилнитрозоуреидопропандиолов, которые по химическому строению близки к нитрозоалкилмочевинам и являются препаратами алкилирующего механизма действия. В клинике препараты из группы нитрозоалкилмочевин, в частности ломустин – (CCNU; N-(2-хлорэтил)-N'-циклогексил-N-нитрозомочевина), являются достаточно эффективными при первичных и метастатических опухолях мозга [4–6]. В этой связи было бы целесообразно в доклинических исследованиях оценить активность хлонизола при интракраниальных опухолях. Следует учесть, что фармакокинетические исследования хлонизола на лабораторных животных показали хорошую проницаемость этого соединения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [1]. В настоящее время интракраниальная трансплантация опухолей в ткань мозга является одной из моделей мозговых метастазов у лабораторных животных [7]. В недавно опубликованной работе мы детально описали методику интракраниальной трансплантации опухолей у мышей и представили результаты высокой ингибирующей активности хлонизола на меланому B16, используемой на такой модели [8]. Мы решили продолжить изучение хлонизола на модели с интракранильной трансплантацией, используя другие опухолевые штаммы (карциному Эрлиха и саркому 180) с параллельным тестированием референтного препарата – ломустина.

Цель исследования – изучить активность разрабатываемого нового соединения – 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиола (хлонизола) в сравнении с ломустином из близкой по химическому строению группы нитрозоалкилмочевин на модели интракраниально трансплантированных опухолях Эрлиха и саркомы 180 у мышей.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. В опытах были использованы взрослые мыши самки линии BALB/c с массой тела 20–25 г, которые содержались в стандартных условиях вивария: искусственном световом режиме 12/12 (свет/темнота), проточно-вытяжной вентиляции и температуре 20–24 °С. Животные получали стандартный комбинированный корм (ООО «Лабораторкорм») и питьевую воду *ad libitum*.

Все экспериментальные исследования проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), под контролем этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Тестируемые вещества (*препараты*). В экспериментах использовался ломустин (МЕДАК ГМБХ, Германия) и хлонизол, синтезированный фирмой КемКонсалт (Санкт-Петербург) по нашей оригинальной методике [2].

Дизайн эксперимента. Использовали стандартные перевиваемые опухолевые штаммы карциномы Эрлиха и саркомы 180. Интракраниальную трансплантацию этих опухолей производили по методике, являющейся модификацией метода внутримозгового заражения мышей вирусом бешенства [9]. Через прокол в черепе мышам инокулировали в мозговую ткань $5{\times}10^5$ клеток опухоли Эрлиха (асцитическая жидкость) или 10 % взвесь опухолевых клеток саркомы 180 (солидный узел) в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида в объёме 0,025 мл. Технические детали этой методики и морфологические признаки внутримозгового роста трансплантата описаны в предыдущей работе с меланомой B16 [8]. После интракраниальной трансплантации каждой опухоли животные были рандомизированы и сформированы три группы: для контроля (введение растворителя) и лечения ломустином и хлонизолом. Через 24 часа после трансплантации опухолей вводили хлонизол и ломустин однократно в максимально переносимых дозах (соответственно, 20 мг/кг и 50 мг/кг). Хлонизол вводили внутрибрюшинно (в/б) в 0,9 % растворе хлорида натрия. Нерастворимый в воде ломустин вводили, соответственно его клиническому применению, перорально зондом в виде взвеси в 2,5 % растворе крахмала.

Критериями оценки терапевтического эффекта используемых препаратов было увеличение продолжительности жизни животных со дня трансплантации опухоли до дня гибели мышей-опухоленосителей или их эвтаназии в терминальном состоянии. Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) оценивали по формуле:

$$\text{УПЖ} = (\text{МПЖ}_э - \text{МПЖ}_к)/\text{МПЖ}_к \times 100,$$

где: $\text{МПЖ}_к$ – медиана продолжительности жизни в контрольной группе;

$\text{МПЖ}_э$ – медиана продолжительности жизни в экспериментальной группе с тестируемыми препаратами.

Как известно, медиана общей выживаемости соответствует периоду времени, который переживает половина подопытных мышей. Кроме того, по мере роста опухолевого трансплантата регистрировали изменения в состоянии животных (снижение потребления корма и массы тела, вялость и поздние проявления в виде клонико-тонических судорог.

Статистический анализ результатов. Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с помощью пакета GraphPad Prism версии 8.0. Критерий Манна—Уитни использовали для сравнения количественных данных. Для сравнения категориальных переменных применяли точный критерий Фишера. Данные по общей выживаемости животных графически были представлены в виде кривых Каплана—Мейера. Для сравнения этих кривых применяли логранговый критерий. Все критерии были двусторонними. Различия считались статистически значимыми при $p < 0{,}05$. Отношение рисков (Hazard Ratio, HR) и границы его 95 % доверительного интервала (95 % ДИ) рассчитывали с помощью регрессионной модели Кокса.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Сравнительная активность хлонизола и ломустина в опытах с интракраниально трансплантированной опухолью Эрлиха у мышей / Comparative activity of chlonisol and lomustine in experiments with intracranially transplanted Ehrlich's tumor in mice

Исследование проведено на 34 мышах. Как можно видеть из рис. 1, введение хлонизола значительно увеличило общую продолжительность жизни мышей с интракраниально трансплантированной опухолью

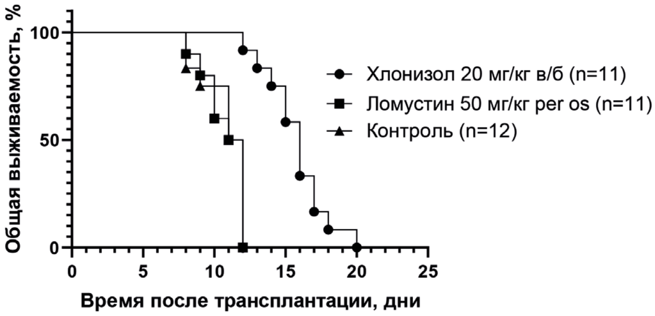


Рис. 1. Динамика выживаемости мышей с трансплантированной интракраниально карциномой Эрлиха при применении хлонизола и ломустина. (Кривые Каплана–Мейера общей выживаемости мышей в трёх группах)
Fig. 1. Survival dynamics of mice with intracranially transplanted Ehrlich's carcinoma treated with chlonisol and lomustine. (Kaplan-Meier curves of overall survival of mice in three groups)

Эрлиха. В противоположность этому при использовании ломустина отмечалась низкая выживаемость у мышей, близкая к контролю. Такое же различие эффектов сравниваемых препаратов отразилось при расчёте риска смерти мышей: хлонизол снижал риск на 73 % к контролю (HR = 0,2681; 95 % ДИ = 0,1006–0,7142; $p < 0,0001$), тогда как ломустин не оказал статистически значимого влияния (HR = 1,028; 95 % ДИ = 0,4434–2,3818; $p = 0,9234$).

К 13-му дню после трансплантации в контрольной группе погибли все мыши. К этому сроку при лечении ломустином отмечалась почти тотальная смертность мышей-опухоленосителей (близкая контролю), тогда как после применения хлонизола подавляющее их большинство оставались живы (табл. 1). Медиана продолжительности жизни мышей, получивших хлонизол, достоверно увеличилась по сравнению с контролем ($p < 0,0001$), тогда как при применении ломустина была близкой к контролю (табл. 1).

Сравнительная активность хлонизола и ломустина в опытах с интракраниально трансплантированной саркомой 180 у мышей / Comparative activity of chlonisol and lomustine in experiments with intracranially transplanted sarcoma 180 in mice

Исследование проведено на 30 мышах. Кривые выживаемости в течение наблюдения демонстрируют очевидный терапевтический эффект хлонизола на интракраниально трансплантированнную саркому 180 и его отсутствие при применении ломустина (рис. 2).

Введение ломустина не снизило риска смерти мышей по сравнению с контролем (HR = 0,8564; 95 % ДИ = 0,3535–2,063; $p = 0,6841$). В противоположность этому хлонизол снизил риск смерти мышей на 83 % по сравнению с группой контроля (HR = 0,1688; 95 % ДИ = 0,05167–0,5513; $p < 0,0001$).

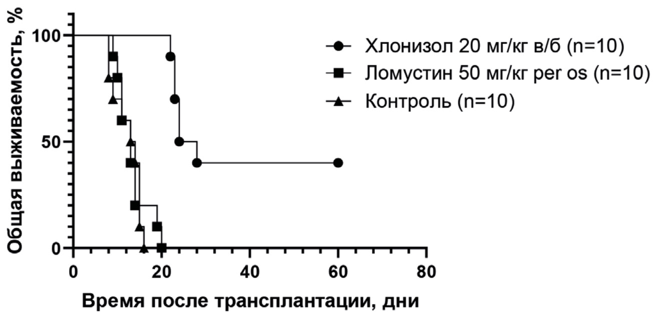


Рис. 2. Динамика выживаемости мышей с трансплантированной интракраниально саркомой 180 при применении хлонизола и ломустина. (Кривые Каплана–Мейера общей выживаемости мышей в трёх группах)
Fig. 2. Survival dynamics of mice with intracranially transplanted sarcoma 180 treated with chlonisol and lomustine. (Kaplan-Meier curves of overall survival of mice in three groups)

Таблица 1

Влияние хлонизола и ломустина на общую выживаемость и медиану продолжительности жизни мышей после интракраниальной трансплантации опухоли Эрлиха

Table 1

Effect of chlonisol and lomustine on overall survival and median lifespan in mice after intracranial Ehrlich's tumor transplantation

Группа / Group	Все мыши / прожившие 13 дней / All mice / surviving 13 days	МПЖ (дни) / MLS (days)	95 % ДИ / 95 % CI	УПЖ / ILE (%)	p (достоверность к контролю и группе с ломустином) / p (significance to control and lomustine group)
I. Контроль	12/0	11,5	9,0–12,0		
II. Ломустин 50 мг/кг, перорально	11/1 $p = 0,2856$ (I)	12,0	9,0–12,0	4 % (I)	0,7735 (I)
III. Хлонизол 20 мг/кг, в/б	11/10 $p < 0,0001$(I) $p = 0,0001$(II)	16,0	14,0–18,0	39 % (I) 33 % (II)	<0,0001(I) <0,0001(II)

Примечания: МПЖ – медиана продолжительности жизни; УПЖ – увеличение продолжительности жизни по сравнению с контролем; 95 % ДИ – 95 % доверительный интервал; (I) – УПЖ и p по отношению к группе I; (II) – УПЖ и p по отношению к группе II.
Notes: МПЖ (MLS) – median life expectancy; УПЖ (ILE) – increase in lifespan compared with control, 95 % CI – 95 % confidence interval; (I) – ILE and p in relation to group I; (II) – ILE and p in relation to group II.

Таблица 2

Влияние хлонизола и ломустина на общую выживаемость и медиану продолжительности жизни мышей после интракраниальной трансплантации саркомы 180

Table 2

Effect of chlonisol and lomustine on overall survival and median lifespan in mice after intracranial transplantation of sarcoma 180

Группа / Group	Все мыши/ прожившие 60 дней / All mice / surviving 60 days	МПЖ (дни) / MLS (days)	95 % ДИ / 95 % CI	УПЖ / ILE (%)	*p* (достоверность к контролю и группе с ломустином) / *p* (significance to control and lomustine group)
I. Контроль	10/0	13,5	8,0–15,0		
II. Ломустин 50 мг/кг, перорально	10/0	13,00	10,0–19,0	0 %	0,1666 (I)
III. Хлонизол 20 мг/кг, в/б	10/4	26,00	23,0–60,0	84 %	<0,0001(I) <0,0001(II)

Примечания: МПЖ – медиана продолжительности жизни; УПЖ – увеличение продолжительности жизни по сравнению с контролем; 95 % ДИ – 95 % доверительный интервал; (I) – *p* по отношению к группе I; (II) – *p* по отношению к группе II.
Notes: МПЖ (MLS) – median life expectancy; ILE (УПЖ) – increase in lifespan compared with control; 95 % CI – 95 % confidence interval; (I) – ILE and *p* in relation to group I; (II) – ILE and *p* in relation to group II.

Применение ломустина не увеличило медиану продолжительности жизни (МПЖ) мышей, тогда как под влиянием хлонизола МПЖ возросла на 84 % (табл. 2). В группе мышей, получивших хлонизол, 40 % животных прожили свыше 60 дней, а в группах контроля и ломустина все мыши погибли к 20-му дню после трансплантации саркомы 180 (рис. 2, табл. 2).

Представленные результаты опытов с интракраниальной трансплантацией двух опухолевых штаммов – карциномы Эрлиха и саркомы 180 у мышей убедительно показывают, что хлонизол в отличие от ломустина проявляет высокую активность. Ранее нами было установлено, что при таком же способе интракраниальной трансплантации хлонизол способен оказывать выраженный терапевтический эффект на меланому B16 (у мышей) и глиому 35 (у крыс) [1, 8]. Отсутствие эффекта у ломустина не является случайным. Например, торможение роста опухоли Эрлиха, перевитой внутримышечно, при применении ломустина не превышало 39 % [10], что расценивается, по принятым критериям (меньше 50 %), как низкая активность. В сравнительном тестировании ломустин уступал по активности хлонизолу при стандартном способе трансплантации карциномы Льюиса и саркомы 37 [1]. В то же время ломустин проявил высокую противоопухолевую активность на модели трансплантированного экстра- и интракраниально HER-положительного рака молочной железы у мышей линии FVB/N [10]. Эти данные свидетельствуют о том, что при тестировании на экспериментальных опухолях могут быть различия в активности у соединений близких по химической структуре и схожему механизму действия (оба препарата алкилирующего механизма действия). Хлонизол растворим в воде, тогда как ломустин – нерастворим, но оба являются жирорастворимыми и хорошо проникают через ГЭБ [1, 11].

К настоящему времени установлена высокая активность хлонизола на нескольких опухолевых штаммах, в том числе при интракраниальной трансплантации, что свидетельствует о его широком спектре противоопухолевого действия. Более высокая активность хлонизола, чем у ломустина, даёт основание рассматривать его как потенциальный цитостатик при лечении опухолей НС.

Заключение / Conclusions

Хлонизол обладает широким спектром противоопухолевого эффекта, проявляя активность не только при стандартных способах перевивки опухолей, но и после интракраниальной трансплантации, который рассматривается в качестве способа моделирования первичных и метастатических опухолей головного мозга. Выявленные эффекты важны для планирования дальнейшего его изучения как перспективного противоопухолевого средства.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Участие авторов. Змитриченко Ю.Г. – проведение экспериментов и систематизация материала, написание статьи; Стуков А.Н. – сбор и систематизация материала, критические замечания; Александров В.А. – концепция, анализ полученных результатов, написание статьи; Муразов Я.Г. – статистическая обработка результатов; Точильников Г.В., Латипова Д.Х., Филатова Л.В. — редактирование текста статьи; Семиглазова Т.Ю. — критические замечания, финальное утверждение рукописи.

Participation of authors. Zmitrichenko IuG — conducting experiments and systematization of the material, writing an article; Stukov AN — collection and systematization of the material, critical remarks; Alexandrov VA — concept, analysis of the results, writing an article; Murazov IaG — statistical processing of the results; Tochilnikov GV, Latipova DH, Filatova LV — editing the text of the article; Semiglazova TYu — critical remarks, final approval of the manuscript.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Змитриченко Юлия Геннадьевна
e-mail: zmitrichenko@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9137-9532
м. н. с. научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Zmitrichenko Yuliya G.
e-mail: zmitrichenko@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9137-9532
Junior Research Scientist, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of MoH of Russia, St. Petersburg, Russia

Стуков Александр Николаевич
e-mail: stukov2008@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1741-6630
SPIN-код: 4652-8674
д. м. н., с. н. с. научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Stukov Alexander N.
e-mail: stukov2008@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1741-6630
SPIN code: 4652-8674
Dr. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Department of Innovative methods of Therapeutic Oncology and Rehabilitation, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of MoH of Russia, St. Petersburg, Russia

Александров Валерий Анатольевич
Автор, ответственный за переписку
e-mail: alexandrov.valeri@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0019-2685
д. м. н., профессор, в. н. с. научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Aleksandrov Valerij A.
Corresponding author
e-mail: alexandrov.valeri@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0019-2685
Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of MoH of Russia, St. Petersburg, Russia

Точильников Григорий Викторович
e-mail: gr75@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4232-8170
SPIN-код: 4366-6930
к. м. н., заведующий научной лабораторией химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Tochilnikov Grigory V.
e-mail: gr75@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4232-8170
SPIN code: 4366-6930
PhD, Cand. Sci. (Med.), Head of the Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of MoH of Russia, St. Petersburg, Russia

Муразов Ярослав Геннадьевич
e-mail: yaroslav84@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-6573-3112
SPIN-код: 2770-5375
к. б. н., н. с. научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Murazov Iaroslav G.
e-mail: yaroslav84@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-6573-3112
SPIN code: 2770-5375
PhD, Cand. Sci. (Biology), Research Scientist, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of MoH of Russia, St. Petersburg, Russia

Латипова Дилором Хамидовна
e-mail: dilat77@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8906-0370
SPIN-код: 5124-5881
к. м. н., врач-онколог, химиотерапевт ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Latipova Dilorom H.
e-mail: dilat77@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8906-0370
SPIN code: 5124-5881
PhD, Cand. Sci. (Med.), Oncologist, chemotherapist, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of MoH of Russia, St. Petersburg, Russia

Филатова Лариса Валентиновна
e-mail: larisa_filatova@list.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0728-4582
SPIN-код: 2564-9233
д. м. н., врач-онколог ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Filatova Larisa V.
e-mail: larisa_filatova@list.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0728-4582
SPIN code: 2564-9233
Dr. Sci. (Med.), Oncologist, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of MoH of Russia, St. Petersburg, Russia

Семиглазова Татьяна Юрьевна
e-mail: tsemiglazova@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4305-6691
SPIN-код: 9773-3759
д. м. н., профессор, в. н. с. научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации, заведующая научным отделом инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Semiglazova Tatiana Yu.
e-mail: tsemiglazova@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4305-6691
SPIN code: 9773-3759
Dr. Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher, Scientific Department of Innovative methods of Therapeutic oncology and Rehabilitation, Head of the Scientific Department of Innovative methods of Therapeutic oncology and Rehabilitation, NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of MoH of Russia, St. Petersburg, Russia

Список литературы / References

1. Островская Л.А., Филов В.А., Ивин Б.А. и др. Хлонизол – новый эффективный противоопухолевый препарат из класса нитрозоалкилмочевин. *Российский биотерапевтический журнал*. 2004;3(1):37–48. [Ostrovskaya LA, Filov VA, Ivin BA, et al. Chlonizol – the new alkylnitrosourea drug with antitumor activity. *Russian biotherapeutic journal*. 1998;3(1):37–48. (In Russ).].

2. Stukov AN, Esikov KA, Usmanova LM, et al. Synthesis and antitumor activity of 2-[3-(2-chloroethy)-3-nitrosoureido] -1,3-propanediol (chlonisol). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(6):579–581. DOI: 10.1007/s11094-020-02242-7

3. Стуков А.Н., Вершинина С.Ф., Харитонова Н.Н. и др. Отечественное противоопухолевое соединение 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозуреидо]-1,3-пропандиол (хлонизол). *Острая токсичность. Токсикологический вестник*. 2020;6(165):49-53. [Stukov AN, Vershinina SF, Kharitonova NN, et al. Domestic antitumor compound 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol). Acute toxicity. *Toxicological Review*. 2020;6(165):49-53. (In Russ).]. DOI: 10.36946/0869-7922-2020-6-49-53

4. Nikolova T, Roos WP, Krämer OH, et al. Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017; 1868(1):29–39. DOI: 10.1016/j.bbcan.2017.01.004

5. Насхлеташвили Д.Р., Банов С.М., Бекяшев А.Х. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению метастатических опухолей головного мозга. В кн. *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO* №3s2, 2020 (том 10).08. [Naskhletashvili DR, Banov SM, Bekyashev AKh, et al. Practical guidelines for drug treatment of metastatic brain tumors. *In book: Malignant Tumors: RUSSCO Practice Guidelines* No. 3s2, 2020 (vol. 10).08. (In Russ).].

6. Weller M, Le Rhun E. How did lomustine become standard of care in recurrent glioblastoma? *Cancer Treat Rev*. 2020;87:102029. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102029.

7. Cruz-Muñoz W, Kerbel RS. Preclinical approaches to study the biology and treatment of brain metastases. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(2):123–130. DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.12.001.

8. Муразов Я.Г., Стуков А.Н., Змитриченко Ю.Г., Нюганен А.О., Точильников Г.В., Латипова Д.Х., Филатова Л.В., Семиглазова Т.Ю. Оценка противоопухолевой активности 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиола (хлонизола) у мышей C57BL/6 с трансплантированной интракраниально меланомой B16. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):23–29. [Murazov IaG, Stukov AN, Zmitrichenko IuG, Niuganen AO, Tochilnikov GV, Latipova DH, Filatova LV, Semiglazova TYu. Evaluation of the antitumor activity of 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol) in C57BL/6 mice with intracranially transplanted B16 melanoma. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1):23–29. (In Russ).].

9. Стуков А.Н., Филатова Л.В., Латипова Д.Х. и др. Терапевтическая активность гемцитабина при интракраниальных опухолях. *Вопросы онкологии*. 2015;61(2):274–279. [Stukov AN, Filatova LV, Latipova DKh et al. Therapeutic activity of gemcitabine in intracranial tumors. *Voprosy onkologii*. 2015;61(2):274–279. (In Russ).].

10. Стуков А.Н., Вершинина С.Ф., Козявин Н.А., Семиглазова Т.Ю., Филатова Л.В., Латипова Д.Х., Иванцов А.О., Беспалов В.Г., Семёнов А.Л., Беляева О.А., Киреева Г.С., Александров В.А., Точильников Г.В., Васильева И.Н., Майдин М.А., Тындык М.Л., Круглов С.С., Янус Г.А., Юрова М.Н. Изучение активности ломустина при перевиваемом HER2-положительном раке молочной железы у мышей линии FVB/N, трансгенных по HER2. *Сибирский онкологический журнал*. 2019;18(5):54–60. [Stukov AN, Vershinina SF, Koziavin NA, Semiglazova TYu, Filatova LV, Latipova DKh., Ivantsov AO, Bespalov VG., Semenov AL., Belyaeva OA, Kireeva GS, Alexandrov VA, Tochilnikov GV, Vasilyeva IN, Maydin MA, Tyndyk ML, Kruglov SS, Yanus GA, Yurova MN. Study of the effect of lomustin on HER2-positive breast cancer in FVB/N HER-2 transgenic mice. *Siberian Journal of Oncology*. 2019;18(5):54–60. (In Russ).]. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-54-60

11. Lee FY, Workman P, Roberts JT, Bleehen NM. Clinical pharmacokinetics of oral CCNU (lomustine). *Cancer Chemother Pharmacol*. 1985;14(2):125–131. DOI: 10.1007/bf00434350

Противовоспалительное действие производных 5-оксипиримидина на модели индуцированного полным адъювантом Фрейнда отёка стопы и скакательного сустава у крыс

Журиков Р. В., Коваленко Л. П., Никитин С. В.

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

Аннотация. В опытах на 60 аутбредных самцах крыс массой 180–200 г изучено противовоспалительное действие производных 5-оксипиримидина: СНК-411 [2 изобутил-4,6 диметил-5 оксипиримидина] и СНК-578 [хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина] в сравнении с преднизолоном на ПАФ-индуцированный отёк стопы и скакательного сустава крыс. Преднизолон, СНК-411 и СНК-578 вводили 2 раза за 24 и 2 часа до введения полного адъюванта Фрейнда (ПАФ). Преднизолон вводили в дозе 10 мг/кг, СНК-411 – в дозах 25 и 40 мг/кг, СНК-578 – в дозах 10 и 25 мг/кг. Отёк стопы и скакательного сустава регистрировали через 24 часа после субплантарного введения 0,1 мл ПАФ в правую лапу. Двукратное введение преднизолона в дозе 10 мг/кг вызывало значимое подавление отёка стопы в плюсневой области и скакательного сустава у крыс, СНК-578 в дозе 25 мг/кг подавлял экссудативный отёк стопы, введение СНК-411 в дозе 40 мг/кг вызывало значимое подавление отёка стопы и скакательного сустава. Полученные результаты согласуются с данными о противоаллергенном действии производных 5-оксипиримидина на модели системной реакции анафилаксии в опытах на морских свинках.

Ключевые слова: производные 5-оксипиримидина; преднизолон; полный адъювант Фрейнда (ПАФ)

Для цитирования:
Журиков Р. В., Коваленко Л. П., Никитин С. В. Противовоспалительное действие производных 5-оксипиримидина на модели индуцированного полным адъювантом Фрейнда отёка стопы и скакательного сустава у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(3):33–36. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-33-36
Поступила: 19 сентября 2022 г. **Принята:** 21 сентября 2022 г. **Опубликована:** 24 октября 2022 г.

Anti-inflammatory properties of 5-hydroxypirimidine derivatives on the model of CFA-induced paw and ankle joint edema in rats

Zhurikov RV, Kovalenko LP, Nikitin SV

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

Abstract. Anti-inflammatory potency of 5-hydroxypyrimidine derivatives SNK-411 (2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-hydroxypirimidine) and SNK-578 (hydrochloride 2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-hydroxypirimidine) was evaluated on the model of complete Freund`s adjuvant (CFA)-induced exudative inflammation in experiment on 60 outbreed male rats weighing 180–200 g in comparison with prednisolone. Prednisolone, SNK-411 and SNK-578 were injected twice: in 24 and 2 hours in before the injection of CFA. Prednisolone was administered in dose of 10 mg/kg, SNK-411 in doses of 25 mg/kg and 40 mg/kg, SNK-578 in doses of 10 mg/kg and 25 mg/kg. Paw and ankle joint edema were registered 24 hours after subplantar injection of CFA in right hind foot. Prednisolone administration in dose of 10 mg/kg decreased paw and ankle joint edema, SNK-578 in dose of 25 mg/kg decreased exudative edema of the paw, SNK-411 in dose of 40 mg/kg decreased paw and ankle joint edema. Acquired data correlates with previously obtained results that 5-hydroxypirimidine derivatives have antiallergenic effect on the model of systemic anaphylaxis in experiment on guinea pigs.

Keywords: 5-hydroxypyrimidine derivatives; prednisolone; complete Freund`s adjuvant (CAF)

For citations:
Zhurikov RV, Kovalenko LP, Nikitin SV. Anti-inflammatory properties of 5-hydroxypirimidine derivatives on the model of CFA-induced paw and ankle joint edema in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(3):33–36. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-33-36
Received: September 19, 2022. **Accepted:** September 21, 2022. **Published:** October 24, 2022

Введение / Introduction

Различные патологические изменения иммунной системы при хронических воспалительных иммунных процессах приводят к росту аллергических и онкологических заболеваний. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), частота аллергических патологий за последнее десятилетие выросла в 2–3 раза, аллергическими заболеваниями страдают 10–20 % детского населения, на протяжении жизни аллергические заболевания проявляются почти у каждого третьего человека планеты [1, 2].

В отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезировано производное 5-оксипиримидина: СНК-411 [2 изобутил-4,6 диметил-5 оксипиримидин, патент RU2518889 C2 (Bull. № 16, 10.06.2014, ФИПС, Москва)], обладающее выраженными противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами. Для получения препарата с улучшенными технологическими характеристиками, более выраженной противоопухолевой и противоаллергенной активностью было синтезировано новое соединение СНК-578 [хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина – патент RU 2686672 C1 (Bull. №13, 30.04. 2019, ФИПС, Москва)].

СНК-411 и СНК-578 являются малотоксичными соединениями: $ЛД_{50}$ СНК-411 при внутрибрюшинном (в/б) введении аутбредным мышам самцам составляет 625 мг/кг, при пероральном введении $ЛД_{50}$ составляет 1399 мг/кг, у СНК-578 $ЛД_{50}$ при в/б введении составляет

547 мг/кг, оптимальные дозы для курсового введения мышам-опухоленосителям разных линий составили: для СНК-411 – 25 мг/кг, для СНК-578 – 10 мг/кг. СНК-411 и СНК-578 обладают противоаллергенным действием, сопоставимым с супрастином, уменьшая гибель от анафилаксии морских свинок альбиносов [3].

Модель отёка лапы крыс, индуцированного полным адъювантом Фрейнда (ПАФ), является пилотной и позволяет быстро оценить способность производных 5-оксипиримидина влиять на экссудативную фазу воспаления, в индукции которого основную роль играют продукты липооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты [4]. Целью настоящего исследования было изучение влияния производных 5-оксипиримидина в сравнении с преднизолоном на ПАФ-индуцированный отёк стопы и скакательного сустава крыс.

Материалы и методы / Material and methods

В настоящей работе изучение действия производных 5-оксипиримидина в сравнении с преднизолоном на ПАФ-индуцированный отёк стопы и скакательного сустава крыс было проведено на 60 аутбредных самцах крыс массой 160–180 г (по 10 животных в каждой группе), полученных из питомника «Филиал «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» России (Московская обл.). Животных содержали при 12-часовом световом режиме на стандартном сбалансированном брикетированном корме со свободным доступом к пище и воде при естественном освещении и температуре воздуха 20–21 °С. Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199н от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях) и правилами работы с животными, утверждёнными этической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

В качестве препарата сравнения использовали преднизолон (Reneval). Преднизолон, СНК-411 и СНК-578 вводили внутрибрюшинно 2 раза за 24 часа и 2 часа до введения ПАФ, преднизолон вводили в дозе 10 мг/кг, СНК-411 в дозах 25 мг/кг и 40 мг/кг, СНК-578 – в дозах 10 и 25 мг/кг. Отёк стопы и скакательного сустава регистрировали инженерным микрометром через 24 часа после субплантарного введения 0,1 мл ПАФ (Sigma) в правую лапу.

Исследование проведено на самцах аутбредных крыс в 6 группах:

1) группа активного контроля с ПАФ, которым вводили 0,1 мл ПАФ;

2) группа животных с ПАФ, которым вводили в/б дважды за 24 часа и 2 часа до ведения ПАФ преднизолон в дозе 10 мг/кг;

3) группа животных с ПАФ, которым вводили в/б дважды за 24 часа и 2 часа до ведения ПАФ СНК-578 в дозе 10 мг/кг;

4) группа животных с ПАФ, которым вводили в/б дважды за 24 часа и 2 часа до ведения ПАФ СНК-578 в дозе 25 мг/кг;

5) группа животных с ПАФ, которым вводили в/б дважды за 24 часа и 2 часа до ведения ПАФ СНК-411 в дозе 25 мг/кг;

6) группа животных с ПАФ, которым вводили в/б дважды за 24 часа и 2 часа до ведения ПАФ СНК-411 в дозе 40 мг/кг.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения STATISTICA 12. Проверка на нормальность распределения проводилась с применением критерия Шапиро–Уилка. Все регистрируемые характеристики животных представлены в таблицах в виде медианы, первого и последнего квартилей M (Q1:Q4). Для проверки гипотезы об однородности групп исследования с нормальным распределением в исследуемой популяции проводили тестирование отсутствия различий между группами при помощи *t*-критерия Стьюдента. В случае распределения, отличающегося от нормального, для сравнения показателей использовался непараметрический критерий Манна–Уитни. Результаты считались статистически достоверными, если значение *p* было меньшим или равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение / Results and discussion

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Изменение диаметра стопы в плюсневой области и скакательного сустава правой задней конечности крыс с вызванным ПАФ воспалительным процессом.

Как видно из результатов, представленных в таблице двукратное введение преднизолона в дозе 10 мг/кг вызывало значимое подавление отёка плюсневой области стопы и скакательного сустава у крыс, иммунизированных ПАФ. Введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг и СНК-411 в дозе 25 мг/кг не подавляло экссудативный отёк стопы и скакательного сустава, вызванный ПАФ. СНК-578 в дозе 25 мг/кг значимо уменьшал отёк стопы в плюсневой области. СНК-411, введённый в/б в дозе 40 мг/кг, значимо подавлял отёк стопы и скакательного сустава. Таким образом, введение СНК-411 в дозе 40 мг/кг оказывает сопоставимый с преднизолоном, введённым в дозе 10 мг/кг, противовоспалительный эффект на отёк стопы и скакательного сустава. При введении СНК-578 в дозе 25 мг/кг не наблюдалось уменьшение диаметра скакательного сустава.

Таблица 1

Изменение диаметра стопы в плюсневой области и скакательного сустава правой задней конечности крыс с вызванным полным адъювантом Фрейнда воспалительным процессом

Table 1

Changes in the diameter of the foot in the metatarsal region and the ankle joint of the right hind limb of rats with complete Freund's adjuvant – induced inflammation

Группа, *n* = 10	Активный контроль ПАФ	Преднизолон 10 мг/кг	СНК-578 10 мг/кг	СНК-578 25 мг/кг	СНК-411 25 мг/кг	СНК-411 40 мг/кг
Диаметр стопы, см	2,25 (2,17:2,68)	1,92 (1,77:1,98)*	2,16 (1,98:2,35)	1,96 (1,67:2,16)*	2,34 (2,13:2,45)	1,77 (1,4:2,05)*
Диаметр сустава, см	1,82 (1,6:2,02)	1,27 (0,9:1,81)*	1,52 (0,73:1,95)	1,6 (1,38:1,89)	1,61 (1,15:1,76)	1,17 (0,65:1,32)*

Примечания: *n* – число животных в группе; * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой по критерию Манна-Уитни.
Notes: *n* – number of animals in groups; * – $p < 0,05$ statistically significant difference in comparison to control group, Mann-Whitney test

Воспаление является многокомпонентным процессом, с множеством альтернативных и перекрещивающихся связей. При аллергических реакциях немедленного типа, в частности аллергической бронхиальной астме, метаболизм арахидоновой кислоты в основном идёт по липооксигеназному пути [5]. При индукции ПАФ-индуцированного отёка лапы крыс основную роль играют продукты липооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты [4]. Полученные в данной работе результаты согласуются с данными о противоаллергенном действии производных 5-оксипиримидина на модели системной реакции анафилаксии на овальбумин в опытах на морских свинках альбиносах. СНК-411 при в/б введении в дозе 50 мг/кг в 1,8 раза подавлял индекс анафилактической реакции по Weigle на овальбумин. СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг также обладал противоаллергенным действием, в 2,8 и в 10 раз подавляя индекс анафилактической реакции по Weigle [3].

Таким образом, полученные данные указывают на возможное подавление производными 5-оксипиримидина липооксигеназного пути воспаления, что целесообразно изучить в дальнейших исследованиях.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № ЕГИСУ 122020100334-2.

Financing. The work was carried out within the framework of State task № ЕГИСУ 122020100334-2.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. Authors declare that there is no conflict of interest.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Журиков Руслан Владимирович
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1084-690X
SPIN-код: 6648-1794
м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Zhurikov Ruslan V.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-1084-690X
SPIN code: 6648-1794
Junior researcher of laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Коваленко Лариса Петровна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: kovalenko.larisa@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2083-0832
SPIN-код: 5185-4250
д. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kovalenko Larisa P.
Corresponding author
e-mail: kovalenko.larisa@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2083-0832
SPIN code: 5185-4250
Dr. Sci. Biological, Leading researcher of laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Никитин Сергей Васильевич
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7630-7816
к. х. н., с. н. с. отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Nikitin Sergey V.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7630-7816
PhD, Cand. Sci. (Chemical), Senior researcher of laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Бельская Н.В., Данилец М.Г., Бельский Ю.П. и др. Моделирование системной анафилаксии на мышах линии Balb/c. *Биомедицина*. 2010;(1):37–50. [Belska NV, Danilets MG, Belsky YP, et al. Modelling of an anaphylaxis using BALb/c mice. *Biomedicine*. 2010; 1(1):37–50 (In Russ).].

2. Кузубова Н.А., Титова О.Н. Т2-ассоциированные заболевания: в фокусе коморбидный пациент. *Медицинский совет*. 2020;(17):57–64. [Kuzubova N.A., Titova O.N. T2-associated diseases: focus on the comorbid patient. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2020;(17):57–64. (In Russ).]. DOI: 10.21518/2079-701X-2020-17-57-64

3. Коваленко Л.П., Коржова К.В., Никитин С.В. Противоаллергенная и противовоспалительная активность производных 5-оксипиримидина (СНК-411 и СНК-578). *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2020;83(10);9–12. [Kovalenko LP, Korzhova KV, Nikitin SV. Antiallergic and anti-inflammatory activity of 5-oxypyrimidine derivatives (SNK-411 and SNK-578). *Experimental and clinical pharmacology*. 2020;83(10):9–12. (In Russ.)]. DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-10-9-12

4. Утешев Д.Б. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1 / под ред. А.Н. Миронова. Москва: Гриф и К; 2012. 501. [Uteshev DB. Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniyu lekarstvennih stredstv dlya lecheniya bronhialnoi astmi i hronicheskoy obstruktivnoi bolezni legkih. Rukovodstvo po provedeniyu issledovaniy lekarstvennih sredstv. Ed by Mironov AN. Moscow: Grif I K; 2012. (In Russ).].

5. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearse N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*. 2002;57(7):643–648. DOI: 10.1136/thorax.57.7.643.

Количественное определение потенциального противосудорожного средства ГИЖ-298 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

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

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

Аннотация. ГИЖ-298 – новое производное 4-фенилпирролидона, обладающее противосудорожным и ноотропным действием. Разработана и валидирована селективная и чувствительная ВЭЖХ-МС методика количественного определения ГИЖ-298 в плазме крови крыс. Линейность методики подтверждена высоким коэффициентом корреляции (>0,99). Процент извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови в среднем составил 73,4±3,4 %. Правильность в течение одного рабочего цикла и между циклами была ≤4,01 %, прецизионность ≤8,03%. Изучение стабильности ГИЖ-298 выявило, что исследуемое соединение устойчиво в биоматрице при комнатной температуре (4 ч), при нахождении в термостатируемом автосемплере (8 °C) в течение аналитического эксперимента, при длительном хранении при –50 °C в течение 30 суток, а также если подвергается нескольким циклам замораживания / размораживания (3 цикла). Изучена фармакокинетика ГИЖ-298 в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 60 мг/кг.

Ключевые слова: ГИЖ-298; высокоэффективная жидкостная хроматография–масс-спектрометрия; плазма крови; валидация методики

Для цитирования:
Бочков П. О., Кравцова О. Ю., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Бойко С. С., Жердев В. П. Количественное определение потенциального противосудорожного средства ГИЖ-298 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(3):37–45. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-37-45
Поступила: 19 сентября 2022 г. **Принята:** 21 сентября 2022 г. **Опубликована:** 24 октября 2022 г.

Quantification of a potential anticonvulsant drug GIZh-298 in rat plasma by liquid chromatography–mass spectrometry

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

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. GIZh-298 is a new derivative of 4-phenylpyrrolidone with anticonvulsant and nootropic effects. A selective and sensitive HPLC-MS technique for the quantitative determination of GIZh-298 in rat blood plasma has been developed and validated. The linearity of the technique was confirmed by a high correlation coefficient (>0.99). Recovery of GIZh-298 from blood plasma averaged 73.4 ±3.4 %. Accuracy during one working cycle and between cycles was ≤ 4.01%, precision ≤ 8.03 %. The study of the stability of GIZh-298 revealed that the target compound is stable in a biomatrix at room temperature (4 h), when it is in a thermostatically controlled autosampler (8 °C) during an analytical experiment, with prolonged storage at –50 ° C for 30 days, and also if it is subjected to several freeze-thaw cycles (3 cycle). The pharmacokinetics of GIZh-298 in rat blood plasma after a single intravenous injection at a dose of 60 mg/kg was studied.

Keywords: GIZh-298; HPLC–MS; rat plasma; method validation

For citations:
Bochkov PO, Kravtsova OYu, Kolyvanov GB, Litvin AA, Boyko SS, Zherdev VP. Quantification of a potential anticonvulsant drug GIZh-298 in rat plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(3):37–45. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-37-45
Received: September 19, 2022. **Accepted:** September 21, 2022. **Published:** October 24, 2022.

Введение / Introduction

ГИЖ-298 — новое производное оксима 4-бензоилпиридина, синтезированное в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» [1]. Это соединение обладает противосудорожной активностью, устраняя первично-генерализованные судороги в тестах антагонизма с максимальным электрошоком и коразолом в дозах 0,5–100 мг/кг у грызунов внутрибрюшинно (в/б). LD_{50} после в/б введения для ГИЖ-298 составляет 316 мг/кг (мыши). Таким образом, ГИЖ-298 имеет большую терапевтическую широту [2]. Установлено, что через 50 мин после однократного в/б введения крысам (60 мг/кг) ГИЖ-298 многократно снижал число продолжительных генерализованных высокоамплитудных разрядов в ипси-, контрлатеральной коре (в 46 раз), гиппокампе и гипоталамусе (в 28 раз), вызванных гомоцистеином тиалактона, и у 100 % животных устранял генерализованные тонико-клонические судороги, возникающие в развернутой стадии эпилептического статуса [3].

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методики количественного определения ГИЖ-298 в плазме крови крыс для последующего изучения его экспериментальной фармакокинетики.

Методику валидировали по следующим параметрам: селективность (специфичность), чувствительность, линейность, правильность, прецизионность, воспроизводимость и стабильность. Это первая методика количественного определения ГИЖ-298 в биожидкости с масс-спектрометрическим детектированием, которая может быть применена для доклинических фармакокинетических исследований.

Материалы и методы / Materials and methods

В работе использовали фармацевтическую субстанцию ГИЖ-298 – оксалат О-(2-морфолиноэтил) оксима 4-бензоилпиридина (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Россия), серия 201021, а также следующие реактивы: ацетонитрил («J.T. Baker», США), вода деионизованная («Panreac», «Applichem», ФРГ), кислота муравьиная 85 % («Acros Organics», РФ).

Оборудование и условия хроматографирования / Equipment and chromatographic conditions

В работе использовали систему высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Ultimate 3000, Thermo Scientific, США), совмещённую с масс-спектрометрическим (МС) детектором – тип тройной квадруполь (TSQ Altis, Thermo Scientific, США). В составе ВЭЖХ: бинарный четырёхканальный насос, дегазатор подвижной фазы, термостат хроматографических колонок, автосемплер, термостат автосемплера. Для регистрации и обработки данных использовали программное обеспечение Xcalibur v.4.2.28.14 (Thermo Scientific, США).

Хроматографическое разделение проводили на колонке «Agilent HILIC Plus», 2,1×50 мм с размером частиц сорбента 3,5 мкм (температура колонки – 40 °С) в режиме градиентного элюирования: 0,0 мин – 95 % Б; 1,0–2,2 мин – 50 % Б; 2,3–3,5 мин – 95 % Б. Скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила (Б) и воды деионизованной (А), содержащих 0,1 % кислоты муравьиной (по объёму).

Калибровочные стандарты и образцы контроля качества / Calibration standards and quality control samples

Матричный раствор ГИЖ-298 (0,1 мг/мл) готовили, растворяя навеску в воде деионизованной. Рабочие стандартные растворы требуемой концентрации для построения калибровочных кривых и образцов контроля качества (КК) были приготовлены путём серийных разведений на воде деионизованной. Все растворы до их использования хранили в холодильнике при 8 °С. Растворы (модельные) для построения калибровочных кривых ГИЖ-298 готовили внесением рабочего стандартного раствора эквивалентного 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 и 5000 нг/мл исследуемого вещества в интактную плазму крови крыс. Образцы КК (модельные растворы) также готовили на плазме крови (25, 100, 1000, 2500 нг/мл).

В настоящей методике биоматрицей для приготовления модельных растворов служила плазма крови крыс с массой тела 180–220 г, полученных из питомника «Филиал «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» России (Московская обл.). У интактных животных пробы крови отбирали декапитацией в пробирки, содержащие 100 мкл 5 % K_2ЭДТА. Плазму крови отделяли центрифугированием при 3500 об/мин в течение 10 мин, замораживали при −50 °С и хранили без добавления консервантов.

Пробоподготовка / Sample preparation

Пробоподготовку проводили методом осаждения белков плазмы крови органическим растворителем. К 100 мкл образца плазмы крови прибавляли 400 мкл ацетонитрила. Полученный раствор перемешивали на встряхивателе Vortex в течение 5 с и на платформе горизонтального встряхивателя в течение 15 мин, затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин. Отбирали надосадочный слой и переносили в виалы хроматографические с дополнительной внутренней вставкой объёмом 250 мкл. Виалы помещали в термостатируемое устройство (8 °С) автоматического ввода образцов. Объём вкола составлял 5 мкл.

Валидационные характеристики / Validation characteristics

Аналитическую методику определения ГИЖ-298 валидировали по следующим показателям: селективность (специфичность), чувствительность, линейность, правильность, прецизионность, воспроизводимость и стабильность.

Для оценки влияния мешающих определению веществ и селективности (специфичности) анализировали экстракт плазмы крови, полученный от 6 разных интактных крыс. Для количественного определения целевого соединения строили калибровочные кривые методом линейной регрессии, откладывая по оси ординат (Y) площадь хроматографического пика ГИЖ-298 и по оси абсцисс (X) его концентрации в нг/мл. Нижний предел количественного определения (НПКО) (чувствительность методики) оценивали как наименьшую концентрацию, которую можно было обсчитать с приемлемой прецизионностью (≥20 %) и правильностью (80÷120 %). Прецизионность (точность) определяли как относительное стандартное отклонение, RSD (%) по формуле:

$$RSD, \% = (\text{стандартное отклонение, SD/среднее, Mean}) \times 100$$

Прецизионность (точность) и правильность методики оценивали, анализируя образцы (25, 100 1000 и 2500 нг/мл) в течение 1 и 3 дней, соответственно.

Правильность выражали в виде отклонения относительной погрешности, RE: относительная погрешность, % = (Расчётная концентрация × 100) / Теоретическая концентрация

Отклонение правильности, RE % = |относительная погрешность – 100|

Отклонение (как в большую, так и меньшую сторону) расчётной концентрации от теоретической для калибровочных проб и образцов КК должно составлять ≤15 % (отклонение правильности).

Воспроизводимость внутри одного рабочего цикла и между несколькими рабочими циклами оценивалась, исходя из правильности и прецизионности.

Критерии приемлемости вышеперечисленных валидационных параметров оценивали в соответствии с требованиями ЕАЭС, EMA и FDA [4–7].

Эффект матрицы, степень извлечения и эффективность обработки / Matrix effect, recovery and process efficiency

Расчёт степени извлечения проводили с использованием площадей хроматографических пиков, полученных при анализе проэкстрагированных модельных растворов ГИЖ-298 (преэкстракционных) и модельных растворов, приготовленных на заранее проэкстрагированной интактной плазме (постэкстракционных). Концентрации ГИЖ-298 в пре- и постэкстрационных спайках: 25, 100, 1000, 2500 нг/мл (приготовление – однократно, анализ в 6 повторностях).

Для определения эффективности обработки сравнивали результаты анализа преэкстракционных модельных растворов (с концентрациями: 25, 100, 1000, 2500 нг/мл) с результатами анализа водных стандартных растворов ГИЖ-298 с такими же концентрациями (приготовление – однократно, анализ в 6 повторностях).

Определение эффекта матрицы проводили с использованием площадей хроматографических пиков водных стандартных растворов ГИЖ-298 (с концентрациями: 25, 100, 1000, 2500 нг/мл) и площадей пиков, полученных при анализе постэкстракционных модельных растворов, содержащих целевое соединение в тех же концентрациях (приготовление – однократно, анализ в 6 повторностях).

Стабильность / Stability

Исследование стабильности ГИЖ-298, которое проводили на образцах КК (концентрации: 25, 100, 1000 нг/мл, приготовление – однократно, анализ в 6 повторностях), включало:

а) изучение стабильности при многократном замораживании/размораживании (3 полных цикла замораживания/ размораживания, при –50 °C, цикл = 24 ч);

б) изучение стабильности при кратковременном хранении (3 ч) модельных растворов при комнатной температуре;

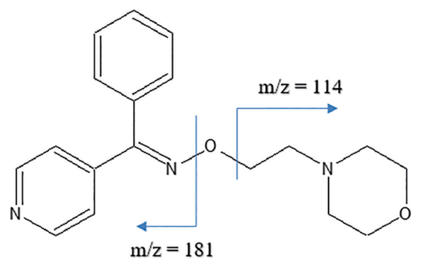
в) изучение стабильности при нахождении готовых проб в автосемплере (при 8 °C) в течение анализа и дольше, но не более 48 ч;

г) изучение стабильности при долговременном хранении (30 дней) модельных растворов при –50 °C.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

В ходе МС анализа выявлено, что для ГИЖ-298 отмечается масс-спектрометрический отклик как в положительном, так и отрицательном режимах ионизации. Однако интенсивность сигнала в положительном режиме значительно выше по сравнению с отрицательным. ГИЖ-298 соответствовал родительский молекулярный ион $[M+H]^+$ равный 312. Для количественного определения аналита использовали MRM-режим (multiple reaction monitoring, режим мониторинга множественных реакций), обеспечивающий лучшую селективность и чувствительность.

На рис. 1 представлена структура и продукты фрагментации ГИЖ-298, а также типичный масс-



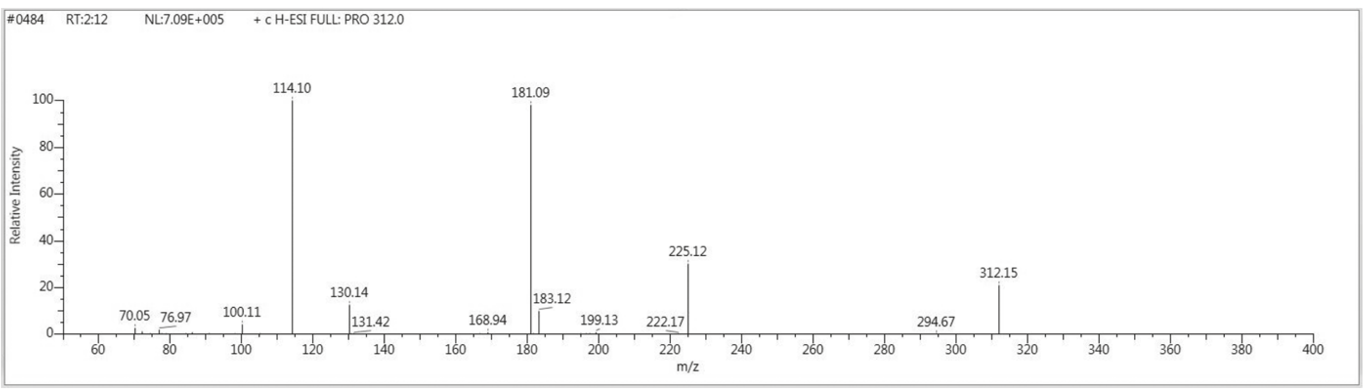


Рис. 1. Структура и фрагментация ГИЖ-298
Fig. 1. Structure and fragmentation of GIZh-298

спектр родительского и дочерних молекулярных ионов. Регистрацию спектров проводили в MRM-режиме по дочерним ионам с отношением массы к заряду $m/z = 114$ и $m/z = 181$, полученным изолированием и фрагментацией нативного молекулярного иона с отношением массы к заряду $m/z = 312$ ([M+H]+). Напряжение на капилляре составило 3500 В, температура испарителя 350 °C, температура капилляра переноса ионов составила 325 °C; энергия фрагментации в коллизионной ячейке 20 В. Остальные параметры камеры распылителя были установлены в автоматическом режиме программным обеспечением в соответствии со скоростью потока подвижной фазы.

Хроматографическое разделение проводили на колонке «Agilent HILIC Plus», обеспечивающую нормальную форму пика, эффективность разделения, приемлемую линейность и воспроизводимость на фоне эндогенных соединений. Оптимизацию состава подвижной фазы проводили исходя из селективности пика аналита и его времени удерживания. В описанных ранее условиях время удерживания аналита составило 1,5 мин. На рис. 2 представлена хромато-масс-спектрограмма интактной плазмы крови крыс, а на рис. 3 – плазмы крови крысы, содержащей 5 нг/мл ГИЖ-298 (НПКО).

Пробоподготовка / Sample preparation

Выбор метода извлечения исследуемого вещества из биоматрицы основывался на его простоте, низкой стоимости по сравнению с твёрдофазной и жидкость-жидкостной экстракциями и достаточной эффективности. В качестве осаждающего агента использовали: этиловый, метиловый спирты и ацетонитрил. Ацетонитрил проявил себя как наиболее эффективный и доступный агент для осаждения белков при экстракции ГИЖ-298 (процент извлечения в среднем составил 73,4±3,4 %).

Валидационные характеристики / Validation characteristics

Селективность, специфичность / Selectivity, specificity

В результате изучения селективности (специфичности) методики (при анализе 6 интактных (холостых) и 6 модельных растворов ГИЖ-298 с концентрацией 5 нг/мл плазмы) показано, что компоненты биоматрицы не интерферируют с пиком целевого соединения (ни по времени удерживания, ни по величине пика). Типичные хроматограммы интактной плазмы крови и НПКО ГИЖ-298 представлены на рис. 2 и 3.

Количественное определение целевого соединения. Линейность методики / Quantification. Linearity

Калибровочные кривые ГИЖ-298 получали линейным регрессионным анализом наименьших квадратов. Для количественного анализа использовали взвешенную регрессию (1/x). Характеристики полученных калибровочных кривых представлены в табл. 1.

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики / Low level of quantification (LLOQ)

При построении калибровочных кривых выявлен НПКО (прецизионность 12 % и отклонение правильности 84÷115 %) применяемой методики в плазме крови крыс – 5 нг/мл при соотношении сигнал/шум >10

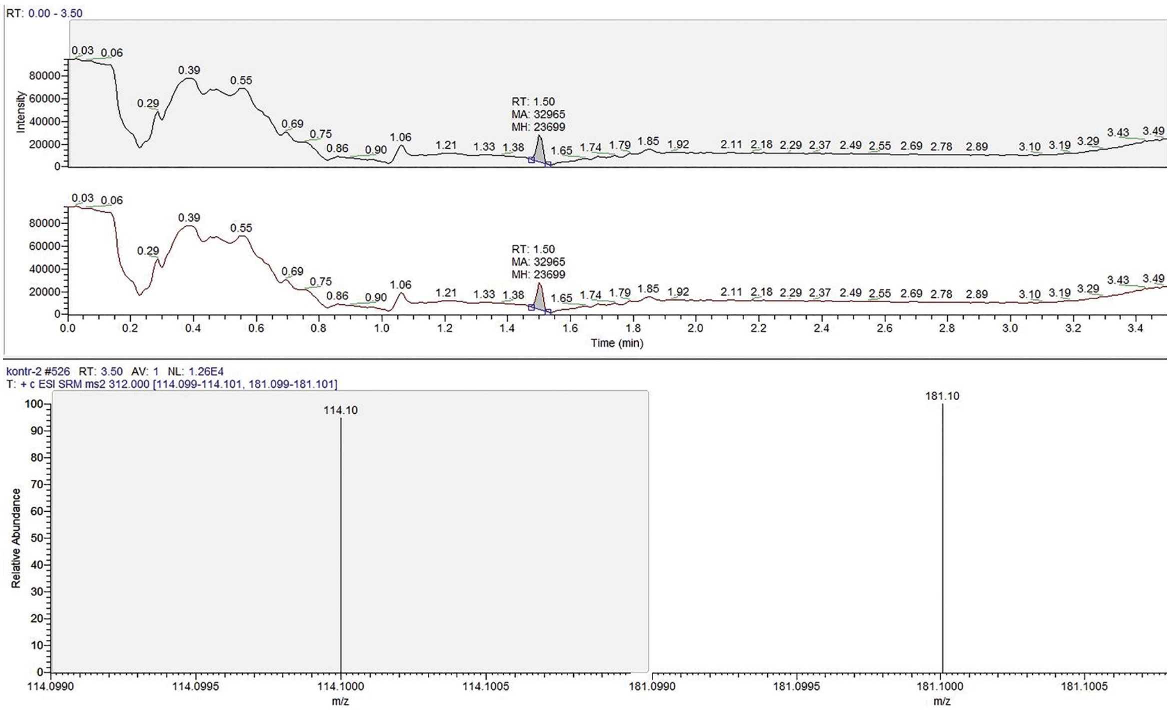


Рис. 2. Хромато-масс-пектрограмма интактной плазмы крови крыс
Fig. 2. Chromatograms and mass-spectrum of the rat blank blood plasma

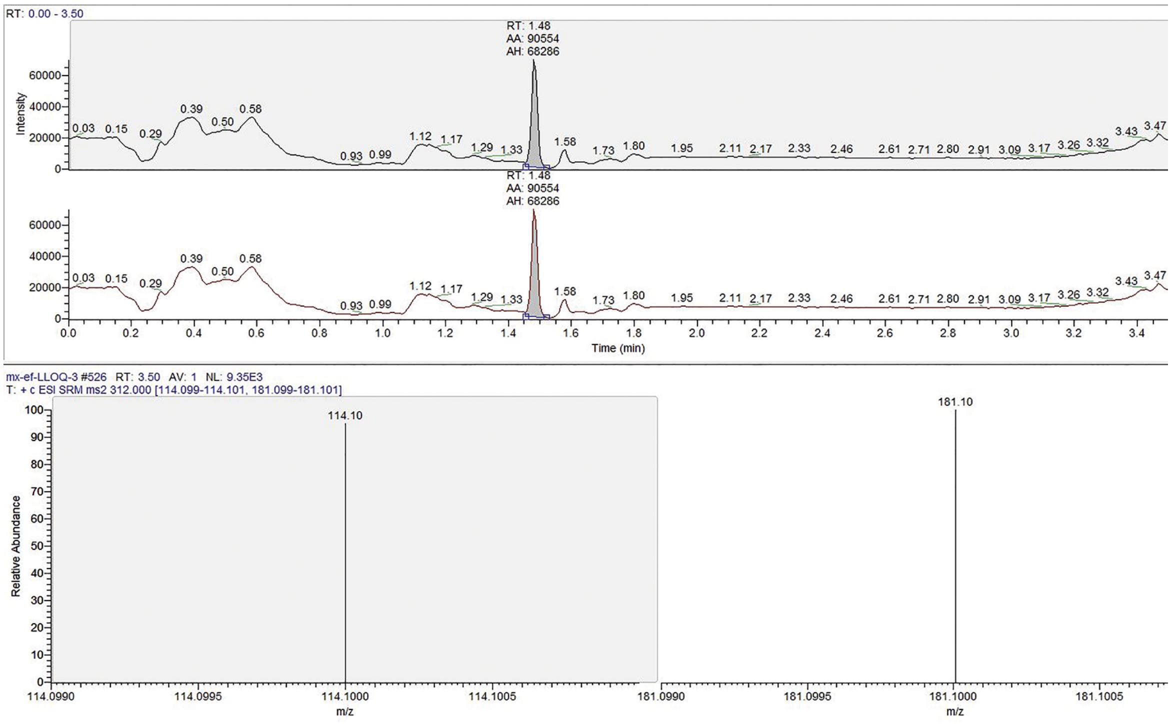


Рис. 3. Хромато-масс-пектрограмма плазмы крови крыс, содержащей ГИЖ-298 в концентрации 5 нг/мл (НПКО)
Fig. 3. Chromatograms and mass-spectrum of GIZh-298 LLOQ = 5 ng/mL of rat blood plasma

Таблица 1

Характеристики калибровочных кривых

Table 1

Calibration curves characteristics

День валидации / Validation day	Уравнение / Equation	Коэффициент корреляции (r) / Correlation coefficient (r)	Диапазон линейности / Linearity range	Количество калибровочных уровней / Number of calibration levels
1-й	Y = 25146,9×X + 23414,4	0,997	5÷5000	10
2-й	Y = 22802,8×X – 3574,6	0,998	5÷5000	10
3-й	Y = 21558,0×X – 47162,0	0,997	5÷5000	10

Примечания: *Y* – площадь хроматографического пика ГИЖ-298 (условные единицы – cps); *X* – концентрация ГИЖ-298, нг/мл.
Notes: *Y* is the GIZh-298 chromatographic peak area of (conventional units – cps); *X* is the concentration of GIZh-298, ng/ml.

(анализ 6 модельных растворов на плазме из разных источников). На масс-хроматограмме (рис. 3) видно, что пик ГИЖ-298 симметричный, отвечает нормальному распределению, без признаков размывания и раздвоения (площадь пика 82759±8780 cps, высота 64014±5916 counts) со временем удерживания 1,49±0,01 мин.

Правильность, прецизионность и воспроизводимость / Accuracy, Precision and Reproducibility

Результаты анализа образцов КК представлены в табл. 2. Правильность (RE) внутри одного цикла (в течение дня) колебалась от 0,38 до 4,10 %, а RSD в диапазоне 1,95÷8,03 %. Правильность между рабочими циклами изменялась от 1,14 до 3,65 %, а RSD в диапазоне 2,38÷10,06 %, отвечая критериям приемлемости [4–7].

Воспроизводимость внутри одного рабочего цикла и между несколькими рабочими циклами оценивалась, исходя из правильности и прецизионности (см. табл. 2) и отвечала критериям приемлемости.

Эффект матрицы, степень извлечения и эффективность обработки / Matrix effect, recovery and process efficiency

Результаты определения эффекта матрицы (ЭМ), степени извлечения и эффективности обработки представлены в таблице 3. Считается, что эффект матрицы определятся коэкстрактивными веществами биоматрицы, которые обусловливают снижение

Таблица 2

Правильность, прецизионность и воспроизводимость ГИЖ-298 в плазме крови крыс (*n* = 6)

Table 2

Accuracy, precision and reproducibility of GIZh-298 in rat blood plasma (*n* = 6)

Теоретическая концентрация, нг/мл / Theoretic conc. ng/ml	Внутри цикла / Within cycle			Между циклами / Between cycles		
	Расчётная концентрация, нг/мл / Calculated conc. ng/ml	RSD %	RE %	Расчётная концентрация, нг/мл / Calculated conc. ng/ml	RSD %	RE %
25	24,9	5,64	0,38	25,59	10,06	2,36
100	104,1	2,40	4,10	103,65	3,22	3,65
1000	975,9	1,95	2,41	1011,53	2,38	1,15
2500	2563,6	8,03	2,54	2528,48	5,12	1,14

или усиление интенсивности ионизации целевого соединения. В среднем, ЭМ (плазма крови крыс) на ГИЖ-298 составил 93,0±1,2 %. Степень извлечения (процент экстракции) составила в среднем 73,4±3,4 %, а эффективность обработки – 70,1±2,0 % (табл. 3).

Таблица 3

Эффект матрицы, степень извлечения и эффективность обработки (*n* = 6)

Table 3

Matrix effect, Recovery, and Process efficiency (*n* = 6)

Концентрация, нг/мл / Concentration ng/ml	ЭМ, % / EM, %	Процент извлечения, % / Recovery, %	Эффективность обработки, % / Process efficiency, %
25	92,3	69,7	67,9
100	91,8	72,1	69,2
1000	94,5	73,8	71,03
2500	93,3	77,82	72,4
Mean	93,0	73,4	70,1
SD	1,2	3,4	2,0

Таким образом, результаты осаждения белков плазмы ацетонитрилом (как метода пробоподготовки) свидетельствуют о достаточной степени извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови крыс.

Стабильность / Stability

Стабильность ГИЖ-298 изучали на образцах КК в различных условиях хранения. Матричный раствор аналита в метаноле был стабилен при –24 °С в течение 30 суток.

В результате изучения стабильности ГИЖ-298 при многократном замораживании (при –50 °С), а именно после трёх полных циклов замораживания/размораживания выявлено, что содержание анализируемого соединения в модельных растворах на плазме не снижалось (табл. 4).

Данные, полученные в ходе исследования стабильности ГИЖ-298 при разных сроках и температурных условиях хранения (кратковременная стабильность в течение 3 ч при комнатной температуре, в течение 24 ч при нахождении в термостатируемом автосемплере (8 °С), долговременная стабильность при хранении в течение 4 недель при –50 °С), демонстрируют устойчивость целевого соединения к распаду во времени при его нахождении в биологическом материале.

Разработанная методика определения ГИЖ-298 в плазме крови крыс была применена для изучения его фармакокинетики.

Изучение фармакокинетики соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс проводилось после его однократного внутривенного введения (в/в) в дозе 60 мг/кг. Введение крысам в/в раствора фармацевтической

Таблица 4

Стабильность ГИЖ-298 в плазме крови крыс (*n* = 6)

Table 4

GIZh-298 stability in rat plasma (*n* = 6)

Условия хранения / Storage conditions	25 нг/мл			100 нг/мл			1000 нг/мл		
	Mean	RSD, %	RE, %	Mean	RSD, %	RE, %	Mean	RSD, %	RE, %
а	25,55	10,64	2,21	96,34	8,23	3,66	1018,8	8,54	1,88
б	23,85	8,59	4,60	91,26	12,13	8,74	1027,0	4,85	2,70
в	23,32	10,60	6,68	90,08	11,42	9,92	1034,4	4,44	3,44
г	25,35	8,77	1,39	95,48	6,23	4,52	1049,0	3,71	4,90

Примечание: условия хранения описаны в разделе «Материалы и методы».
Note: storage conditions are described in the section "Materials and methods".

субстанции ГИЖ-298 в воде дистиллированной с добавлением 1 капли твина-80 выполняли с помощью шприца. Для определения ГИЖ-298 в плазме крови после его в/в введения образцы крови отбирали до введения (контроль) и через 5, 15, 30, 45 мин, 1,0, 2,0, и 4,0 ч после введения.

Усреднённый фармакокинетический профиль соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс представлен на рис. 4.

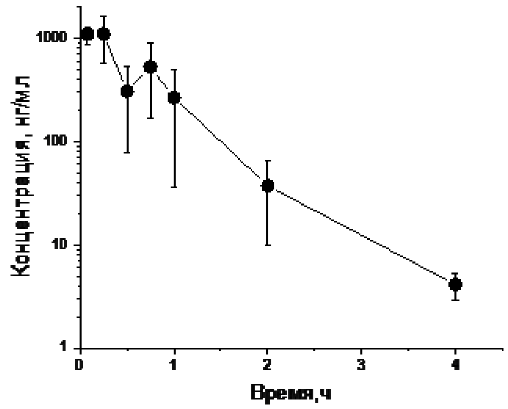


Рис. 4. Фармакокинетическая кривая ГИЖ-298 в плазме крови крыс после однократного в/в введения фармацевтической субстанции в дозе 60 мг/кг (n = 6; Mean±SD)

Fig. 4. Pharmacokinetic profile of the GIZh-298 in rat blood plasma after a single i/v injection of a pharmaceutical substance at a dose of 60 mg/ kg (n = 6; Mean±SD)

Из рис. 4 видно, что снижение концентраций исследуемого соединения в плазме крови носит моноэкспоненциальный характер. Поскольку на каждую временную точку использовали по 6 животных, результирующая фармакокинетическая кривая была построена по усреднённым концентрациям, поэтому при расчётах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов. Фармакокинетические параметры исследуемого соединения в плазме крови животных после однократного в/в введения представлены в табл. 5.

Соединение ГИЖ-298 определяется в плазме крови на протяжении 4 ч. Кажущаяся начальная концентрация (C_0) ГИЖ-298 в плазме крови крыс составила 1402 нг/мл. Учитывая, что период полуэлиминации ($t_{1/2el}$) составил 0,48 ч, соединение ГИЖ-298 можно отнести к группе «короткоживущих» лекарственных веществ. Такие фармакокинетические параметры, как $t_{1/2el}$ и среднее время удерживания вещества в организме (MRT – 0,64 ч) указывают на относительно короткое нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных. Величина кажущегося объёма распределения (V_d) ГИЖ-298 после в/в введения составила 8,71 л/кг. V_d обычно не эквивалентен физиологическому объёму, а отражает распределение препарата и степень его связывания в организме. Так,

Таблица 5

Фармакокинетические параметры соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения фармацевтической субстанции (60 мг/кг)

Table 5

Pharmacokinetic parameters of GIZh-298 in rat blood plasma after a single intravenous injection of a pharmaceutical substance (60 mg/kg)

Параметр / Parameter of the of the	Единицы измерения / unit of measurement	Значения параметра / parameter value
C_0	нг/мл	1 402
$AUC_{0\to t}$	нг/мл×ч	787
$AUC_{0\to\infty}$	нг/мл×ч	790
Cl	л/ч/кг	211
V_d	л/кг	8,71
$t_{1/2el}$	ч	0,48
k_{el}	$ч^{-1}$	1,444
MRT	ч	0,65

если препарат связывается преимущественно белками крови, V_d будет меньше, чем реальный. С другой стороны, преимущественное связывание препарата во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения V_d над реальным объёмом. В нашем случае, расчёт величины V_d дал высокие значения, указывающие на то, что ГИЖ-298 распределяется во внесосудистом пространстве (органах) животных и накапливается в тканях [8].

Заключение / Conclusion

Разработана и валидирована селективная и чувствительная ВЭЖХ-МС методика количественного определения нового потенциального противосудорожного средства ГИЖ-298 в плазме крови крыс. Линейность методики подтверждена высоким коэффициентом корреляции (>0,99). Процент извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови в среднем составил 73,4±3,4 %. Правильность в течение одного рабочего цикла и между циклами была ≤4,01 %, прецизионность ≤8,03 %. Изучение стабильности ГИЖ-298 выявило, что целевое соединение устойчиво в биоматрице при комнатной температуре (4 ч), при нахождении в термостатируемом автосемплере (8 °С) в течение аналитического эксперимента, при длительном хранении при –50 °С в течение 30 суток, а также если подвергается нескольким циклам замораживания/ размораживания (3 цикла).

Таким образом, вышеперечисленные характеристики разработанной методики делают её подходящей для фармакокинетических исследований, а именно для количественного определения концентраций ГИЖ-298 в плазме крови после однократного в/в введения в дозе 60 мг/кг.

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

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, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Кравцова Оксана Юрьевна
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.
e-mail:oukravtsova@yahoo.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0693-2007
SPIN code: 1733-2330
PhD, Cand. Sci. (Biology), researcher scientist of pharmacokinetics laboratory FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Колыванов Геннадий Борисович
e-mail: 7822535@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2571-0047
SPIN-код: 2538-8639
д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. 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
Автор, ответственный за переписку
e-mail: litbiopharm@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2818-3457
SPIN-код: 6193-5770
д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

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

Бойко Светлана Семёновна
e-mail: svboyko@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2177-2010
SPIN-код: 4176-8921
к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Boyko Svetlana S.
e-mail: svboyko@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2177-2010
SPIN code: 4176-8921
PhD, Cand. Sci. (Biology), 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. (Med.), professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Дурнев А.Д., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Гайдуков И.О., Неробкова Л.Н., Гудашева Т.А. Патент РФ № 2643091 от 31.01.2018 «Производные оксимов 4-бензоилпиридина, обладающие противосудорожной активностью, как средства лечения эпилепсии и пароксизмальных состояний». [Durnev AD, Voronina TA, Litvinova SA, Nerobkova LN, Gajdukov IO, Gudasheva TA, Zhmurenko LA, Mokrov GV. Pat. RF № 2643091 31.01.2018 4-benzoylpyridine oxime derivatives having anticonvulsant activity as agents for treatment of epilepsy and paroxysmal states (In Russ).]. URL: https://patenton.ru/patent/RU2643091C2. Ссылка активна на 15.09.2022

2. Жмуренко Л.А, Мокров Г.В., Неробкова Н.Л., Литвинова С.А., Гайдуков И.О., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. Новое производное оксимов 4-бензоилпиридинов ГИЖ-298, обладающее противосудорожной активностью. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2017;(1):22–26. [Zhmurenko LA, Mokrov GV, Nerobkova LN, Litvinova SA, Gaydukov IO, Voronina TA, Gudasheva TA. Novel 4-benzoylpyridine oxime derivative GIZH-298 with ati-convuisant activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2017;(1):22–26. (In Russ).].

3. Гайдуков И.О., Литвинова С.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Авакян Г.Г., Кутепова И.С. Исследование противосудорожного действия производного оксима 4-бензоилпиридина (ГИЖ-298) и вальпроевой кислоты на модели эпилептического статуса у крыс с кобальт-индуцированным очагом. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2017;9(2)57–66. [Gaydukov IO, Litvinova SA, Voronina TA, Nerobkova LN, Zhmurenko LA, Mokrov GV, Avakyan GG, Kutepova IS. 4-Benzoylpyridine oxime derivative (GIZH-298) versus valproic acid: the anticonvulsant potential effect in a model of epilepsy in rats with cobalt-induced lesions. *Epilepsy and paroxysmal conditions.* [*Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya*]. 2017;9(2)57–66. (In Russ).]. DOI: 10.17749/2077-8333.2017.9.2.057-066

4. Изучение биоэквивалентности воспроизведённых лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. – М.: Гриф и К; 2013. –328 с. [Izuchenie bioekvivalentnosti vosproizvedennykh lekarstvennykh sredstv. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv. Tom I. – M.: Grif i K; 2013. (In Russ).].

5. Руководства по экспертизе лекарственных средств Том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, Совет Евразийской экономической комиссии, решение от 3 ноября 2016 № 85. [Rukovodstva po ekspertize lekarstvennykh sredstv Tom I, pravil provedeniya issledovanii bioekvivalentnosti lekarstvennykh preparatov v ramkakh Evraziiskogo ekonomicheskogo soyuza, Sovet Evraziiskoi ekonomicheskoi komissi, reshenie ot 3 noyabrya 2016 No. 85. (In Russ).].

6. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). Bioanalytical method validation. U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018, 41 p.

7. EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011, 23 p.

8. Сергиенко В.И. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение / под ред. В.И. Сергиенко, Р. Джеллифф, И.Б. Бондарева // М.: Издательство РАМН. 2003. 208 с. [Sergienko VI. Prikladnaya pharmakokinetika: osnovnye polozheniya I klinicheskoe primenenie / Ed by. VI Sergienko, R Jelliff, IB Bondareva // Moscow: Izdatelstvo RAMN. 2003. (In Russ).].

Использование препаратов с цереброваскулярной активностью у мышей со сниженным уровнем внимания

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

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

Аннотация. Изучено влияние пикамилона (50 мг/кг/день, в/б), тропоксина (10 мг/кг/день, в/б) и ЛК-933 (9,3 мг/кг/день, в/б) на поведение фенотипов мышей CD-1 с различной устойчивостью внимания в тесте «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт», после 6-кратного внутрибрюшинного введения. Впервые показано, что у мышей с нативным дефицитом внимания препараты, обладающие ноотропной и цереброваскулярной активностью, способствовали восстановлению внимания. Обнаруженный эффект сопровождался изменениями показателей исследовательского поведения, двигательной активности и тревожности у обеих субпопуляций грызунов. Полученные результаты позволяют сделать предположение о необходимости дальнейшего экспериментального изучения влияния препаратов с цереброваскулярными свойствами с использованием предложенной авторами модели синдрома дефицита внимания.

Ключевые слова: дефицит внимания; пикамилон; тропоксин; ЛК-933; закрытый обогащённый крестообразный лабиринт; мыши CD-1

Для цитирования:
Сухорукова Н. А., Салимов Р. М., Ковалёв Г. И. Использование препаратов с цереброваскулярной активностью у мышей со сниженным уровнем внимания. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(3):46–51. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-46-51
Поступила: 19 сентября 2022 г. **Принята:** 22 сентября 2022 г. **Опубликована:** 24 октября 2022 г.

The usage of drugs with cerebrovascular activity in mice with reduced attention level

Sukhorukova NA, Salimov RM, Kovalev GI

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The effect of picamilon (50 mg/kg/day), tropoxin (10 mg/kg/day) and LK-933 (9,3 mg/kg/day) on the behavior of CD-1 mice phenotypes with different attention stability in the "closed enriched cross maze" test after 6 days of intraperitoneal administration was studied. It was shown for the first time that in mice with native attention deficit drugs with nootropic and cerebrovascular activity improved attention. Observed effect was combined with changings of exploratory behavior parameters, motor activity and anxiety in both mice subpopulations. Obtained results allow to make an assumption about further experimental study of drugs with cerebrovascular properties in the attention deficit disorder model proposed by the authors.

Keywords: attention deficit; picamilon; tropoxin; LK-933; closed enriched cross maze; CD-1 mice

For citations:
Sukhorukova NA, Salimov RM, Kovalev GI. The usage of drugs with cerebrovascular activity in mice with reduced attention level. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(3):46–51. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-46-51
Received: September 19, 2022. **Accepted:** September 22, 2022. **Published:** October 24, 2022.

Введение / Introduction

Синдром дефицита внимания (СДВ) характеризуется различными патологическими проявлениями, одним из которых является нарушения гемодинамики спастического характера [1]. Наряду с изменениями упруго-эластических свойств, тонуса сосудов головного мозга и иными нарушениями гемодинамики, данное нейрофизиологическое проявление может ухудшать качество жизни пациентов, начиная уже с раннего возраста [2, 3]. С учётом предполагаемой роли данного патофизиологического компонента в комплексе симптомов СДВ, представилось значимым экспериментальное изучение препаратов, обладающих сосудорасширяющей способностью, при моделировании СДВ в тесте «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт» [4], с использованием которого была подтверждена избирательная эффективность ноотропных препаратов в отношении субпопуляций аутбредных мышей CD=1, различающихся, во-первых, по фенотипам исходного уровня внимания, а во-вторых, по показателям плотности рецепторов в префронтальной коре мозга [5–7]. Для проверки данного предположения нами были выбраны лекарственные средства с цереброваскулярной активностью, различными способами воздействующие на спазм сосудов: производные тропана тропоксин и ЛК-933, проявляющие антисеротониновые свойства, а также никотиновое производное ГАМК пикамилон, разработанные и изученные в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» [8].

Материалы и методы исследования / Materials and methods of research

Эксперименты проводили на самцах аутбредных мышей CD-1, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ (Пущино), массой 23–30 г (*n* = 185), которых содержали в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в стандартных условиях при свободном доступе к воде и корму. Организацию и проведение работ осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г по охране животных, используемых в научных целях. 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). Тропоксин (3,4,5-триметоксибензоат оксима тропинона хлоралгидрат), ЛК-933 (ацилгидразон (2,3,4-триметокси-N-(8-метил-8-азабицикло[3.2.1] октан-3-илиден) бензогидразид гидрохлорид) и пикамилон (N-никотиноил гамма-аминомасляной кислоты натриевая соль) были разработаны и изучены в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (любезно предоставлены профессором Мирзояном Р.С. и к. х. н. Косточкой Л.М.). Остальные реактивы приобретались в коммерческих источниках.

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

Грызунов подвергали поведенческому тестированию в закрытом обогащённом крестообразном лабиринте (ЗОКЛ) с помощью программы Enriset (рис. 1). Тест заканчивался, когда животное совершало 12 визитов в отсеки [4]. Критерием разделения животных на субпопуляции служили значения индекса распознавания новых объектов, определяющегося по формуле:

ED-ratio = 100 × Tenriched/Tempty,

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

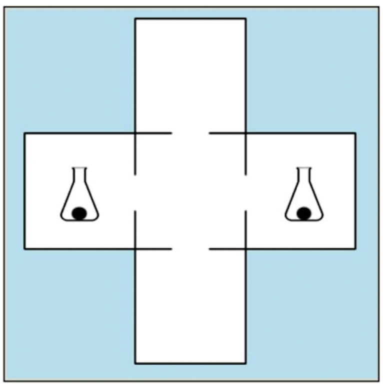
При отсутствии предпочтения рукавов с новыми объектами индекс распознавания составлял около 100 и менее. В популяции мышей CD-1 присутствовало 2 типа особей, которые проявляли (индекс внимания >120, 60–70 % мышей) или не проявляли (индекс внимания <100, 30–40 % мышей) внимание к объектам, имеющимся в лабиринте (рис. 1).

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. Вещества, растворённые в физиологическом растворе, вводили внутрибрюшинно один раз в сутки в течение 6 дней, контрольной группе вводили физиологический раствор в эквивалентном объёме. Выбор дозы и продолжительности введения основывались на данных, полученных ранее в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

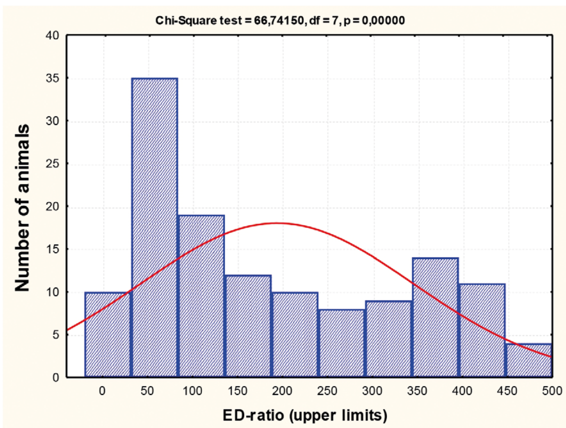
Во время 2-го теста, выполнявшегося в той же обстановке через час после заключительной инъекции, оценивали влияние изучаемых веществ на внимание к обстановке у мышей с известным типом исследовательской реакции на объекты, имеющиеся в лабиринте.

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**, совершённых за время эксперимента, исчисляются числом заходов животного в отсеки лабиринта, совершённых им



А



Б

Рис. 1. Схематическое изображение установки, используемой в тесте «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт» (А) и частотное распределение поведенческих фенотипов аутбредных мышей CD-1 при первичном тестировании (Б).

Fig. 1. Schematic representation of the closed enriched cross maze test (A) and the frequency distribution of CD-1 outbred mice behavioral phenotypes during primary testing (Б).

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_GlTm**. 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_GlTm**. Данные показатели отражают уровень тревожности животного в новой обстановке и могут быть использованы для оценки транквилизирующего (анксиолитического) эффекта.

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 Mann–Whitney. Полученные результаты представлены в виде средних значений с учётом стандартной ошибки среднего (mean±S.E.M).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

При выбранной продолжительности введения тропоксин в дозе 10 мг/кг существенно корректировал индекс ED-ratio (Obj_tR) у животных с исходным дефицитом внимания с 68,3±7,0 до 248,2±19,3 ($p < 0,005$), не оказывая влияния на данный показатель в опытной группе ED-high (табл. 1). В то же время тропоксин увеличивал значения показателя тревожности (F_GlTm), связанного с продолжительностью первого визита в боковой отсек. У фенотипа ED-high субхроническое введение препарата приводило к удлинению первого цикла патрулирования (F_PtrN) и общего времени в боковых отсеках лабиринта (T_GlTm).

При заключительном поведенческом тестировании животных, получавших ЛК-933 в дозе 9,3 мг/кг, эквимолярной использованной дозе тропоксина, была показана различная направленность действия данного вещества на внимание к объектам в лабиринте (табл. 2). При этом у мышей подтипа ED-low не регистрировалось значимых изменений показателей в ЗОКЛ, связанных с двигательной активностью и тревожностью. В опытной группе ED-high субхроническое введение ЛК-933 приводило к ухудшению исследовательской активности животных, выражавшемся в увеличении продолжительности первого цикла патрулирования (F_PtrN), времени в центральном отсеке лабиринта (T_ChTm) и возрастании тревожности в новой обстановке (F_GlTm).

В табл. 3 представлены данные влияния субхронического введения пикамилона в дозе 50 мг/кг на поведение мышей CD-1 в тесте «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт». В результате проведённого эксперимента было установлено, что препарат обладает сходным с тропоксином действием на поведение грызунов обеих субпопуляций в тесте ЗОКЛ. В частности, препарат увеличивал показатель ED-ratio относительно контрольной группы с 56,6±7,7 до 265,3±43,0 ($p < 0,005$) избирательно в отношении субпопуляции ED-low.

Таблица 1

Влияние субхронического введения тропоксина (10 мг/кг/день, внутрибрюшинно) на показатели поведения субпопуляций аутбредных мышей CD-1 в тесте ЗОКЛ (представлены средние арифметические величины и их стандартные ошибки, m±S.E.M.)

Table 1

The effect of subchronical administration of tropoxin (10 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 = 15)	Тропоксин ED-high (n = 16)	Контроль ED-low (n = 15)	Тропоксин ED-low (n = 15)
F_PtrN	**7,3±0,6**	**9,8±0,5#**	8,2±0,8	7,5±0,6
PatrlN	1,1±0,2	1,1±0,1	1,1±0,2	1,3±0,1
F_ChTm	8,4±0,8	8,9±0,8	9,2±0,9	9,6±0,9
F_GlTm	7,7±1,1	8,6±0,8	**7,5±0,8**	**9,8±0,7#**
T_ChTm	51,7±4,2	55,3±4,9	60,9±5,1	66,1±6,1
T_GlTm	**73,4±5,9**	**90,7±4,6#**	80,6±4,7	80,2±8,7
Obj_tR	416,9±41,0	401,6±28,6	**68,3±7,0****	**248,2±19,3##**

Примечания: */** – статистически значимое отличие между субпопуляциями, Mann–Whitney U Test, $p < 0,05/0,005$; #/## – статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, Mann-Whitney U-Test, $p < 0,05/0,005$; ^ – пояснения в разделе Материалы и методы.
Notes: */** – statistically significant difference between subpopulations, Mann-Whitney U test, $p < 0,05/0,005$; #/## – statistically significant difference between control and experimental groups, Mann-Whitney U test, $p < 0,05/0,005$; ^ – explanations are given in the Materials and Methods Section.

Таблица 2

Влияние субхронического введения ЛК-933 (9,3 мг/кг/день) на показатели поведения субпопуляций аутбредных мышей CD-1 в тесте ЗОКЛ (представлены средние арифметические величины и их стандартные ошибки, m±S.E.M.)

Table 2

The effect of subchronical administration of LK-933 (9,3 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* = 20)	ЛК-933 ED-high (*n* = 20)	Контроль ED-low (*n* = 19)	ЛК-933 ED-low (*n* = 19)
F_PtrN	**7,3±0,6**	**8,9±0,4**	**6,7±0,5**	**8,5±0,6#**
PatrlN	1,3±0,1	0,9±0,2	**1,6±0,2**	**1,0±0,2#**
F_ChTm	7,9±0,6	8,2±0,5	9,7±0,6	10,8±0,2
F_GlTm	**10,8±0,5**	**13,2±0,8#**	9,2±0,3	9,8±0,9
T_ChTm	**55,2±3,5**	**73,3±4,9#**	56,3±3,5	63,1±3,9
T_GlTm	68,1±8,4	71,2±5,0	75,5±2,9	71,8±4,4
Obj_tR	**418,4±29,4**	**303,7±41,6#**	**70,8±6,3****	**217,2±20,2##**

Примечания: */** – статистически значимое отличие между субпопуляциями, Mann–Whitney U Test, $p < 0{,}05/0{,}005$; #/## – статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, Mann–Whitney U-Test, $p < 0{,}05/0{,}005$; ^ – пояснения в разделе Материалы и методы.
Notes: */**– statistically significant difference between subpopulations, Mann–Whitney U test, $p < 0{,}05/0{,}005$; #/## – statistically significant difference between control and experimental groups, Mann–Whitney U test, $p < 0{,}05/0{,}005$; ^ – explanations are given in the Materials and Methods Section.

Таблица 3

Влияние субхронического введения пикамилона (50 мг/кг/день) на показатели поведения субпопуляций мышей аутбредной линии CD-1 в тесте ЗОКЛ (m±S.E.M.)

Table 3

The effect of subchronical administration of picamilon (50 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* = 12)	Пикамилон ED-high (*n* = 12)	Контроль ED-low (*n* = 12)	Пикамилон ED-low (*n* = 10)
F_PtrN	6,6±0,7	7,4±0,7	7,6±0,6	6±0,7
PatrlN	1,1±0,1	1,3 ±0,1	1,3±0,2	1,5±0,2
F_ChTm	10,5±1,5	10,9±1,2	11,3±1,6	9,8±1,3
F_GlTm	6,5±1,3	**22,6±3,3#**	9,1±1,1	**36,3±6,3#**
T_ChTm	59,9±6,1	47,3±6,2	72,9±5,8	74,3±7,4
T_GlTm	59,9±3,9	**91,2±8,9#**	67,5±6,7	**101,7±11,2#**
Obj_tR	341,9±33	288,3±41,1	**56,6±7,7***	**265,3±43,0#**

Примечания: */** – статистически значимое отличие между субпопуляциями, Mann–Whitney U Test, $p < 0{,}05/0{,}005$; #/## – статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, Mann–Whitney U-Test, $p < 0{,}05/0{,}005$; ^ – пояснения в разделе Материалы и методы.
Notes: */** – statistically significant difference between subpopulations, Mann-Whitney U test, $p < 0{,}05/0{,}005$; #/## – statistically significant difference between control and experimental groups, Mann-Whitney U test, $p < 0{,}05/0{,}005$; ^ – explanations are given in the Materials and Methods Section.

Следовательно, обнаружено, что в результате 6-кратного введения оба производных тропана (тропоксин и ЛК-933) и ГАМК-производное (пикамилон) оказывают положительное влияние на уровни внимания (**Obj_tR**) в субпопуляции **ED-low**, увеличивая их величину в 3,6; 3,1 и 3,6 раз по сравнению с соответствующим контролем. При этом лишь тропоксин и пикамилон демонстрируют избирательность в отношении субпопуляции с исходным дефицитом (**ED-low**).

Вместе с тем, действие всех трёх веществ сопровождалось нежелательными эффектами в отношении других параметров поведения: тропоксин и, в особенности ЛК-933, ухудшали показатели эффективности исследовательского поведения, увеличивали тревожность и общее время исследования лабиринта. Пикамилон не уменьшал эффективности исследовательского поведения, но действовал неизбирательно на уровень тревожности (**F_GlTm**) и общую продолжительность пребывания в отсеках лабиринта (**T_GlTm**).

Заключение / Conclusion

Предпосылками для выполнения данной работы послужили несколько групп фактов: (а) комплексное психоневрологическое обследование детей 7–12 лет с синдромом дефицита внимания (СДВ) методами ЭЭГ, допплерографии церебральных сосудов, кранио- и спондилографии выявило: в 76 % случаев нарушения церебрального кровотока спастического характера в вертебробазилярном бассейне, выраженную венозную дистонию (67 %), нарушения биоэлектрической активности (60 %) [1]; (б) наличие положительной связи между СДВ и мигренью как у детей, так и у взрослых [9, 10]; (в) успешное использование в комплексном лечении ноотропных, сосудистых, общеукрепляющих препаратов, приведшее к улучшению характеристик поведения, концентрации внимания, школьной успеваемости, прекращению головной боли [1, 11]; (г) подтверждение положительного влияния препаратов ноотропного ряда на уровень внимания и рецепторных механизмов их действия на трансляционной модели дефицита внимания в экспериментах на мышах [5–7, 12].

Ранее в экспериментальных работах, проведённых в Лаборатории радиоизотопных методов исследований ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», было показано, что ноотропные средства, содержащие фрагмент ГАМК в своей структуре (пантогам, фенибут), оказывают положительное корректирующее действие на дефицит внимания [5, 12], наблюдаемый у грызунов в предложенной экспериментальной модели СВД. Препарат пикамилон (N-никотиноил-ГАМК), относящийся к фармакотерапевтической группе «Ноотропное средство» [13], отличается по своему механизму от специфического ноотропного действия других ноотропов [14] по преобладанию в нём выраженного влияния на мозговое кровообращение, чувствительное к пикротоксину, антагонисту ГАМК$_A$-рецепторов [8].

Препарат тропоксин, предупреждающий или значительно ослабляющий констрикторные реакции мозговых сосудов, обладает сродством к 5HT$_2$-рецепторам, конкурируя *in vitro* с меченым спипероном за места специфического связывания с Ki = = 1,172·10^{-7}M [8, 15, 16]. Оригинальное соединение ЛК-933, синтезированное в отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», также проявляет выраженную антисеротониновую цереброваскулярную активность, однако в сравнении с тропоксином обладает меньшей токсичностью и превосходит его по продолжительности этого действия [17]. Интересно отметить, что ноотропные препараты пирацетам, пантокальцин, семакс и ноглютил избирательно модулируют в условиях *ex vivo* 5HT$_2$-рецепторы мозга у мышей 1CR с фенотипом дефицита эффективности исследовательского поведения [18].

Таким образом, впервые получены результаты по изучению влияния препаратов с цереброваскулярной активностью на мышах с фенотипом сниженного уровня внимания. Показано, что как ГАМК-, так и 5HT-рецепторный компонент могут в дальнейших экспериментах послужить основой для изыскания веществ, сочетающих полезные ноотропные и цереброваскулярные свойства.

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 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. Мубаракшина А.Р. Асфиксия как фактор риска развития синдрома дефицита внимания с гиперактивностью у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*, 2007;6:67–72 [Mubarakshina AR. Asphyxia as a risk factor of attention deficit and hyperactivity disorder in children. *Ros Vestn Perinatol Pediat.* 2007;(6):67–72 (In Russ).].

2. Грибанов А.В., Мельникова Л.А., Федотов Д.М. Мозговая гемодинамика у детей 11–14 лет с синдромом дефицита внимания с гиперактивностью. *Вестник Северного (Арктического) Федерального Университета. Серия: Медико-биологические науки.* 2014;(3):16–26. [Gribanov AV, Melkova LA, Fedotov DM. Cerebral hemodynamics in children aged 11–14 years with attention deficit hyperactivity disorder. *Vestnik Severnogo (Arkticheskogo) federal'nogo universiteta. Ser.: Mediko-biologicheskie nauki*, 2014;(3):16–26 (In Russ).].

3. Мельникова Л.А., Федотов Д.М., Багрецова Т.В. Сравнительный анализ состояния церебрального кровотока у детей 7–14 лет с синдромом дефицита внимания и гиперактивности. *Вестник Северного (Арктического) Федерального Университета. Серия: Медико-биологические науки*, 2014;(4):39–50 [Melkova LA, Fedotov DM, Bagretsova TV Comparative analysis of cerebral blood flow in 7–14-year-old children with attention deficit hyperactivity disorder. *Vestnik Severnogo (Arkticheskogo) federal'nogo universiteta. Ser.: Mediko-biologicheskie nauki*, 2014;(4):39–50. (In Russ).].

4. 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.

5. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В. и др. Влияние пантогама и атомоксетина на устойчивость внимания и распределение дофаминовых D_2 и ГАМКВ-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 GABAB receptors in the attention deficit mouse model. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2021;67(5):402–410 (In Russ).]. DOI: 10.18097/PBMC20216705402.

6. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А. и др., Субхроническое введение семакса повышает устойчивость внимания у мышей CD-1 через модуляцию D2-дофаминовых рецепторов префронтальной коры мозга. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(6):3–10. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Kondrakhin EA, 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.

7. 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 piracetam 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.

8. Мирзоян Р.С., Ганьшина Т.С. Фармакология цереброваскулярных заболеваний и мигрени (сходство и различия). М.: Издательский дом «Третьяковъ»; 2022. 370 с. [Mirzoyan RS, Gan'shina TS. Pharmacology of cerebrovascular diseases and migraine (similarity and differences). Moscow: Izdatel'skij dom «Tret'yakov'»; 2022. (In Russ.).]

9. Salem H, Vivas-Consuelo D, Cao F, et al. ADHD is associated with migraine: a systematic review and meta-analysis. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2018 Mar;27(3):267–277. DOI: 10.1007/s00787-017-1045-4.

10. Hansen TF, Hoeffding LK, Kogelman L, et al. Comorbidity of migraine with ADHD in adults. *BMC Neurol.* 2018;18(1):147. DOI: 10.1186/s12883-018-1149-6.

11. Заваденко Н.Н. Гиперактивность и дефицит внимания в детском возрасте. М.: Юрайт; 2019. 274 с. [Zavadenko NN Giperaktivnost' i defitsit vnimaniya v detskom vozraste. Moscow: Urait; 2019. (In Russ).].

12. 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.

13. Регистр лекарственных средств России. РЛС Энциклопедия лекарств / под ред. Вышковского Г.Л. М.: Веданта; 2017. 1384 с. [Registr lekarstvennykh sredstv Rossii. RLS Entsiklopediya lekarstv. Ed by Vyshkovsky GL. Moscow: Vedanta; 2017. (In Russ).].

14. Ковалёв Г.И., Васильева Е.В., Салимов Р.М. Влияние пикамилона на ГАМК-рецепторы префронтальной коры мозга и поведение мышей C57BL/6 и BALB/c в закрытом крестообразном лабиринте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017;80(3):3–9. [Kovalev GI, Vasil'eva EV, Salimov RM. The action of picamilon on prefrontal-cortex GABA receptors and behavior of C57BL/6 and BALB/c mice in closed cross-maze labyrinth. *Eksperimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiia*, 2017;80(3):3–9 (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2017-80-3-3-9.

15. Мирзоян Р.С., Середенин С.Б., Ганьшина Т.С. и др. Тропоксин – новый антагонист серотонина и потенциальное противомигреневое средство. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 1998;61(3):28–31. [Mirzoyan RS, Seredenin SB, Gan'shina TS, et al. Tropoxin – a new serotonin antagonist and potential anti-migraine drug. *Eksperimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiia*. 1998;61(3):28–31. (In Russ).].

16. Ганьшина Т.С., Горбунов А.А., Гнездилова А.В. и др. Тропоксин – новое средство для лечения мигрени. *Химико-фармацевтический журнал*. 2016;50(1):19–23. [Gan'shina TS, Gorbunov AA, Gnezdilova AV, et al. Tropoxin – a new drug in migraine therapy. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;50(1):19–23. (In Russ).].

17. Мирзоян Р.С., Наплёкова П.Л., Ганьшина Т.С. и др. Новое противомигреневое средство с антисеротониновой, цереброваскулярной и анксиолитической активностью. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017;80(4):8–12. [Mirzoyan RS, Naplekova PL, Gan'shina TS, et al. New antimigraine drug with antiserotonin, cerebrovascular and anxiolytic activity. *Eksperimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiia*. 2017;80(4):8–12 (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2017-80-4-8-12.

18. Фирстова Ю.Ю., Васильева Е.В., Ковалев Г.И. Влияние ноотропных препаратов на 5-HT_{2A}-рецепторы стриатума аутбредных мышей с различной эффективностью исследовательского поведения. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2018;(3):42–47 [Firstova Yu Yu, Vasil'eva EV, Kovalev GI. The effects of nootropic drugs on striatal 5-HT_{2A}-receptors in outbred mice with different efficacy of exploratory behavior. *Farmakokinetica i farmakodinamica*, 2018;(3):42–47. (In Russ).]. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10023.

Сравнительная оценка параметров безопасности на доклиническом и клиническом этапах исследования лекарственного препарата Реамберин® (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»)

Василюк В. Б.[1,2], Фарапонова М. В.[1], Сыраева Г. И.[1,3], Верведа А. Б.[1,4], Бельская А. В.[4], Шульц А. В.[4], Кубарская Л. Г.[4], Золотверхая Е. А.[4]

[1] – Общество с ограниченной ответственностью «Научно-исследовательский центр Эко-безопасность», Санкт-Петербург, Россия

[2] — ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

[3] — ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

[4] — ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологи имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России), Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. *Актуальность*. Интерпретация данных доклинических испытаний лекарственных средств имеет принципиальное значение. Корректность экстраполяции данных, полученных на животных, на человека обусловлены, в том числе, качественным и количественным разнообразием тестируемых систем, регистрируемых параметров и подходов к их интерпретации, а также статистических методов при определении возможного риска для человека. *Цель*. Сравнительная оценка параметров безопасности и переносимости, полученных в ходе доклинического и клинического исследования лекарственного препарата Реамберин® (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»), и выработка подходов к совершенствованию процессов планирования клинических исследований по оценке безопасности и переносимости с учётом результатов доклинических исследований. *Материалы и методы*. Был проведён сравнительный анализ параметров безопасности, возникших в ходе клинического исследования с участием здоровых добровольцев, и отклонений от контрольных уровней клинико-лабораторных показателей, установленных на этапе доклинического исследования на беспородных крысах и кроликах породы шиншилла лекарственного препарата с международным непатентованным наименованием (МНН) – меглюмина натрия сукцинат (торговое наименование (ТН) Реамберин® (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»)). *Результаты*. Установлены однонаправленные отклонения от нормальных (контрольных) значений, выявленные единичные случаи нежелательные явления у добровольцев (повышение активности печёночных трансаминаз, изменения артериального давления), которые не соотносились с данными доклинического исследования. Количество сопоставляемых показателей у лабораторных животных, для которых были установлены статистически значимые различия между опытными и контрольными группами, значительно превышало численность признаков в виде НЯ у добровольцев.

Ключевые слова: Реамберин®; планирование; безопасность; добровольцы; крысы; кролики

Для цитирования:
Василюк В. Б., Фарапонова М. В., Сыраева Г. И., Верведа А. Б., Бельская А. В., Шульц А. В., Кубарская Л. Г., Золотверхая Е. А. Сравнительная оценка параметров безопасности на доклиническом и клиническом этапах исследования лекарственного препарата Реамберин® (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»). *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(3):52–61. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-52-61
Поступила: 12 июля 2022 г. **Принята:** 17 июля 2022 г. **Опубликована:** 24 сентября 2022 г.

Comparative evaluation of safety parameters at the preclinical and clinical stages of the study of the Reamberin® (LLC "POLYSAN")

Vasilyuk VB[1,2], Faraponova MV[1], Syraeva GI[1,3], Verveda AB[1,4], Belskaya AV[4], Shults AV[4], Kubarskaya LG[4], Zolotverkhaya EA[4]

[1] — Limited Liability Company «Research Center Eco-safety», Saint-Petersburg, Russia

[2] — North-Western State Medical University named I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

[3] — FSBEI HE "Academician I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University" of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

[4] — Scientific and clinical center of toxicology named after academician S.N. Golikov Federal Medical and Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

Abstract. *Relevance.* Interpretation of the preclinical trials data is fundamental importance. The correctness of extrapolation of data obtained from animals to humans is due to the qualitative and quantitative diversity of the systems tested the recorded parameters and approaches to their interpretation, as well as statistical methods in determining the possible risk to humans. *Aim*. Comparative assessment of the safety and tolerability parameters obtained during the preclinical and clinical trials of the Reamberin® (LLC «POLYSAN») and the development of approaches to improving clinical trial planning processes for assessing safety and tolerability, taking into accounts the results of preclinical studies. *Materials and methods*. A comparative analysis of the safety parameters that arose during a clinical study involving healthy volunteers and deviations from the control levels of clinical and laboratory parameters established at the stage of a preclinical study on outbred rats and rabbits of the chinchilla breed of a drug with an international non-proprietary name (INN): meglumine sodium succinate (trade name (TN) Reamberin® (LLC «POLYSAN»)). *Results*. Unidirectional deviations from normal (control) values were established. Isolated cases of adverse events among healthy volunteers (increased activity of hepatic transaminases, changes in blood pressure) were identified. This facts didn't correlate with the preclinical study. The number of comparable indicators in laboratory animals, for which statistically significant differences were established between the experimental and control groups, significantly exceeded the number of signs in the form of adverse events among healthy volunteers.

Keywords: Reamberin®; planning; safety; volunteers; rats; rabbits

For citations:
Vasilyuk VB, Faraponova MV, Syraeva GI, Verveda AB, Belskaya AV, Shults AV, Kubarskaya LG, Zolotverkhaya EA. Comparative evaluation of safety parameters at the preclinical and clinical stages of the study of the Reamberin® (LLC "POLYSAN"). *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(3):52–61. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-3-52-61
Received: July 12, 2022. **Accepted:** July 17, 2022. **Published:** September 24, 2022.

Введение / Introduction

Принципы фармакотерапии должны базироваться на особенностях фармакокинетических и фармакодинамичех показателей [1]. Данные параметры всесторонне оцениваются при разработке как оригинального лекарственного средства (ЛС), так и воспроизведённого ЛС, с последующим планированием этапности стратегии исследований *in vitro*/*in vivo*/*ex vivo*. При этом свойства молекул и прогнозируемые для них эффекты и механизмы действия оцениваются поэтапно на основании общих принципов планирования научно-обоснованных программ изучения доклинической и клинической безопасности [2], требований Надлежащей клинической практики и в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской декларации [3]. В целом, регуляторные требования Европейского Союза, Японии и Соединенных Штатов Америки в данной области сопоставимы друг с другом. Все страны, принимающие международные руководства, разработанные Международным советом по гармонизации технических требований к фармацевтическим препаратам для человека (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; ICH), используют гибкие индивидуальные научно-обоснованные подходы к исследованиям доклинической безопасности, необходимые для обоснования возможности проведения клинических исследований и последующей государственной регистрации.

Данные, полученные на этапе доклинической оценки безопасности, используют для определения начальной безопасной клинической дозы и схем последующего повышения дозы при введении людям, установления потенциальных органов-мишеней, подверждённых токсическому влиянию и установления обратимости такой токсичности, а также для определения параметров для клинического мониторинга с целью выявления потенциальных нежелательных эффектов [2, 4, 5]. Важность интерпретации данных доклинических исследований подтверждается повышенным интересом к этой теме со стороны научного сообщества, развитием концептуальных проектов и активным пересмотром методических документов, инициированным регуляторными органами разных стран [6–10].

Доклиническая оценка безопасности для регистрации лекарственных препаратов обычно предусматривает проведение исследований общетоксических свойств, токсикокинетических и доклинических фармакокинетических исследований, исследований репродуктивной токсичности, исследований генотоксичности [5]. Необходимость проведения других доклинических исследований определяется в индивидуальном порядке в соответствие с характеристиками исследуемого препарата.

Таким образом, одной из основных задач доклинических исследований является оценка профиля токсичности исследуемого препарата с последующим определением стартовой дозы для клинических исследований (КИ), впервые проводимых у человека [11–13]. В то же время, при проведении КИ с участием человека, особое внимание должно быть уделено вопросам безопасности субъекта КИ [13]. В основе оценки вопросов безопасности лежит определение количества нежелательных явлений (НЯ), возникших в ходе проведения процедур протокола конкретного КИ, их качество (т. е. принадлежность к определённому системно органному классу, степень тяжести, ожидаемость, установление причинно-следственной связи с исследуемым ЛС и пр.), а также наличие или отсутствие критерия(ев) серьёзности (серьёзное нежелательное явление; СНЯ) [14, 15].

Цель / Aim

Цель настоящей работы состояла в сравнительной оценке параметров безопасности и переносимости, полученных в ходе доклинического и клинического исследования лекарственного препарата Реамберин® (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН») и выработке подходов к совершенствованию процессов планирования клинических исследований по оценке безопасности и переносимости с учётом результатов доклинических исследований.

Материалы и методы / Materials and methods

Был проведён сравнительный анализ НЯ, возникших в ходе клинического исследования с участием здоровых добровольцев, и отклонений от контрольных уровней клинико-лабораторных показателей, установленных на этапе доклинического исследования на беспородных крысах и кроликах породы шиншилла лекарственного препарата с международным непатентованным наименованием (МНН) – меглюмина натрия сукцинат (торговое наименование (ТН) Реамберин® (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»)).

На доклиническом этапе проводилось изучение токсических свойств и местно-раздражающего действия при многократном введении лекарственного препарата Реамберин® на половозрелых (возрастом 2–3 месяца) беспородных крысах и кроликах породы шиншилла обоего пола на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России) (в настоящее время – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства.

Содержание животных соответствовало международным и локальным требованиям [16, 17]. Экспериментальная часть доклинического исследования также получила все регламентированные федеральным законодательством одобрения, в частности исследование одобрено биоэтической комиссией ФГБУН ИТ ФМБА России [18–20].

Животным было осуществлено многократное (в течение 28 суток) инфузионное введение препарата Реамберин® в удельном объёме 10, 20 и 40 мл/кг и физиологического раствора (контрольная группа) в удельном объёме 40 мл/кг. Число опытных животных – 120 крыс и 36 кроликов, число контрольных животных – 40 крыс и 12 кроликов, число интактных животных – 40 крыс и 6 кроликов. В ходе исследования оценивались такие параметры, как выживаемость, клиническая картина интоксикации, динамика массы тела, водо- и кормопотребление, физиологические показатели, гематологические и биохимические показатели; проводились макроскопическое и микроскопическое изучение внутренних органов; сравнивались массовые коэффициенты органов; изучали местно-раздражающее действие.

Клиническое исследование первой фазы «Открытое, рандомизированное исследование безопасности, переносимости препарата Реамберин®, 1,5 %, раствор для инфузий (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН») при однократном внутривенном инфузионном введении препарата в различных дозировках и с различной скоростью введения здоровым добровольцам, и фармакокинетики препарата Реамберин®, 1,5 %, раствор для инфузий (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН») при однократном внутривенном инфузионном, введении препарата объёмом 2000 мл со скоростью 10 мл/мин у здоровых добровольцев» (разрешение Министерства здравоохранения № 300 от 27.06.2018 г.) проведено в соответствии с международными и локальными нормативными требованиями. В исследование было включено 78 здоровых добровольцев, которые были рандомизированы на 2 группы: 1 группа – 39 добровольцев, получавших однократную инфузию препарата Реамберин® объёмом 2000 мл со скоростью 10 мл/мин; 2 группа – 39 добровольцев, получавших однократную инфузию препарата Реамберин® объёмом 1000 мл со скоростью 15 мл/мин [21].

Безопасность препарата оценивали по наличию жалоб, их типу, частоте и тяжести; по изменению показателей физикального обследования и основных жизненно важных параметров (систолическое и диастолическое артериальное давление, частота сердечных сокращений (ЧСС), частота дыхательных движений (ЧДД) и температура тела); изменению данных электрокардиографии и рутинных лабораторных исследований (общий клинический анализ крови, биохимический анализ крови, кислотно-основное состояние крови и общий анализ мочи). Также оценивалась местная переносимость препарата при внутривенном введении (зуд, гиперемия, жжение в месте введения) и переносимость по доле добровольцев, которые досрочно прекратили участие в исследовании из-за возникновения НЯ/СНЯ.

Анализ взаимосвязи данных доклинических и клинических исследований проведён на основе сопоставимых признаков, полученных по результатам обследований.

Результаты / Results

На доклиническом этапе, в качестве критерия выявления отклонений в состоянии здоровья кроликов и крыс выступал признак наличия статистически значимых различий ($p \leq 0,05$) изучаемых показателей в одной из опытных групп по сравнению с контрольной группой.

В табл. 1–3 представлена сравнительная характеристика статистически значимых отклонений изучаемых показателей в опытных группах животных, установленных в ходе проведения доклинических исследований, с НЯ, выявленными у добровольцев в ходе проведения клинического исследования лекарственного препарата Реамберин®. В качестве признака, определяющего наличие или отсутствие взаимосвязи между данными у людей и животных, приведены три характеристики, представленные в столбце «Направленность отклонений»:

- однонаправленные – установленные на лабораторных животных отклонения соответствуют выявленным НЯ у добровольцев;
- разнонаправленные – установленные на лабораторных животных отклонения имеют противоположную направленность с выявленными НЯ у добровольцев;
- отсутствует – установленные у крыс и кроликов отклонения не выявлены в виде НЯ у добровольцев или наоборот.

Наибольшее количество отклонений при изучении токсических свойств и местно-раздражающего действия препарата Реамберин® на лабораторных животных установлено при оценке гематологических и биохимических показателей, доля которых по сравнению с соматическими отклонениями составили для крыс и кроликов, соответственно, 77,2 % и 75,0 %. Необходимо подчеркнуть, что выявленные различия имели случайных характер, не выходили за пределы нормальных значений и свидетельствовали об отсутствии специфической токсичности препарата Реамберин®. Напротив, лабораторные отклонения у добровольцев встречались реже по сравнению с соматическими и выявлены в 9 из 70 случаев (12,9 %). Значительно большее количество отклонений биохимических и гематологических показателей у животных, чем у добровольцев, на наш взгляд, в первую очередь связано с большей длительностью введения препарата (28-дневный курс у лабораторных животных в сравнении с однократным введением добровольцам).

Как следует из табл. 1, отклонения биохимических и гематологических показателей у кроликов и крыс были сопоставимы, но чаще встречались у крыс. При этом важно подчеркнуть, что все НЯ, связанные с изменениями лабораторных показателей у добровольцев, соответствовали отклонениям, выявленным в ходе проведения доклинических исследований на животных.

Статистически значимые отклонения показателей состояния сердечно-сосудистой системы у животных установлены только у крыс (табл. 2) и были связаны с укорочением интервала QT. К однонаправленным изменениям у добровольцев можно отнести ощущение учащённого сердцебиения, сопровождающегося уменьшением продолжительности интервала QT. Удлинение интервала PQ, установленное у крыс, не было выявлено в ходе обследования добровольцев.

Выявленные колебания уровня артериального давления у добровольцев не имели взаимосвязи с аналогичным показателем у животных, что, вероятно, связано не только с отсутствием соответствующих изменений у крыс, а с более низкой частотой его измерения (двукратное по сравнению с десятикратным)

Таблица 1

Сравнительная характеристика статистически значимых отклонений лабораторных показателей у крыс, кроликов и нежелательных явлений у добровольцев

Table 1

Comparative characteristics of statistically significant deviations of laboratory parameters among rats, rabbits and adverse drug reactions in group of healthy volunteers

Отклонения у крыс	Направленность отклонений	Отклонения у кроликов	Направленность отклонения	НЯ добровольцев
Снижение количества эритроцитов	Однонаправленные	–	–	Анемия неуточнённая
Снижение концентрации гемоглобина	Однонаправленные	Снижение концентрации гемоглобина	Однонаправленные	Анемия неуточнённая
Снижение гематокрита	Однонаправленные	Снижение гематокрита	Однонаправленные	Анемия неуточнённая
Снижение количества лимфоцитов	Отсутствует	–	–	–
–	–	Снижение количества нейтрофилов	Отсутствует	–
Снижение количества эозинофилов	Отсутствует	–	–	–
Повышение количества лейкоцитов	Однонаправленные	Повышение количества лейкоцитов	Однонаправленные	Лейкоцитоз
Повышение количества тромбоцитов	Отсутствует	Повышение количества тромбоцитов	Отсутствует	–
Повышение количества нейтрофилов	Однонаправленные	–	–	Нейтрофилез
Повышение количества моноцитов	Отсутствует	–	–	–
Повышение количества базофилов	Отсутствует	Повышение количества базофилов	Отсутствует	-
Снижение концентрации общего белка	Отсутствует	–	–	–
Снижение концентрации альбумина	Отсутствует	–	–	–
Снижение концентрации глобулинов	Отсутствует	–	–	–
Снижение концентрации глюкозы	Отсутствует	–	–	–
Снижение активности ЩФ	Отсутствует	–	–	–
Снижение концентрации билирубина	Отсутствует	Снижение концентрации билирубина	Отсутствует	–
–	–	Повышение концентрации общего белка	Отсутствует	–
–	–	Повышение концентрации глюкозы	Отсутствует	–
Повышение активности АСТ	Однонаправленные	–	–	Повышение АСТ
–	Не определяли	–	Не определяли	Повышение СОЭ

Примечания: НЯ – нежелательное явление; АСТ – аспартатаминотрансфераза; СОЭ – скорость оседания эритроцитов.
Notes: НЯ – AE – adverse event; АСТ – AST – aspartate aminotransferase; СОЭ – ESR – erythrocyte sedimentation rate.

Таблица 2

Сравнительная характеристика статистически значимых отклонений показателей состояния сердечно-сосудистой системы у крыс, кроликов и нежелательных явлений у добровольцев

Table 2

Comparative characteristics of statistically significant deviations in indicators of the state of the cardiovascular system among rats, rabbits and adverse drug reactions in healthy volunteers

Отклонения у крыс	Направленность отклонений	Отклонения у кроликов	Направленность отклонения	НЯ добровольцев
Снижение продолжительности интервала QT	Однонаправленные	–	–	Ощущение учащённого сердцебиения
Увеличение продолжительности интервала PQ	Отсутствует	–	Отсутствует	–
–	Отсутствует	–	Отсутствует	Повышение кровяного давления
–	Отсутствует	–	Отсутствует	Неспецифическое низкое давление

Примечание: НЯ – нежелательное явление.
Note: НЯ – AE – adverse event.

и возможностью добровольцев провести внеочередное измерение артериального давления при ухудшении самочувствия.

Наиболее сложным и неоднозначно определённым способом оценки взаимосвязи данных доклинических и клинических исследований является сопоставление результатов изучения поведенческих реакций в тесте «Открытое поле» у крыс и НЯ со стороны нервной системы у добровольцев (табл. 3). Достаточно условно статистически значимое снижение исследовательской активности (вертикальные стойки) и двигательной активности крыс можно связать с выраженной общей слабостью у людей.

Частота возникновения местной воспалительной реакции у животных, установленная по результатам гистологических исследований, и НЯ в виде нарушений в месте введения у добровольцев в среднем были сопоставимы (табл. 4).

Однако следует отметить, что значимая часть НЯ, зарегистрированных у добровольцев, была связана с

Таблица 3

Сравнительная характеристика статистически значимых отклонений состояния нервной системы у крыс, кроликов и нежелательных явлений у добровольцев

Table 3

Comparative characteristics of statistically significant deviations in the state of the nervous system among rats, rabbits and adverse drug reactions in healthy volunteers

Отклонения у крыс	Направленность отклонений	Отклонения у кроликов	Направленность отклонения	НЯ добровольцев
Повышение исследовательской активности	Отсутствует	–	–	–
Снижение исследовательской активности	Однонаправленные	–	–	Выраженная общая слабость
Снижение двигательной активности	Однонаправленные	–	–	Выраженная общая слабость

Примечание: НЯ – нежелательное явление.
Note: НЯ – AE – adverse event.

Таблица 4

Сравнительная характеристика местно-раздражающего действия у крыс, кроликов и нежелательных явлений у добровольцев

Table 4

Comparative characteristics of local irritant effects among rats, rabbits and adverse drug reactions in healthy volunteers

Отклонения у крыс	Отклонения у кроликов	НЯ добровольцев
Местная воспалительная реакция у 3 из 60 (5 %)	Местная воспалительная реакция у 1 из 32 (3 %)	Нарушения в месте введения у 3 из 78 (4 %)

симптомами, которые трудно было установить при клиническом обследовании лабораторных животных: гиперемия кожи – 23 (29,5 %), инъекция поверхностных вен – 2 (2,6 %), ощущения жара и жжения в различных частях тела – 5 (6,4 %), нарушения кожной чувствительности – 2 (2,6 %), общие симптомы и признаки – 4 (5,1 %) случая, так как широко используемая в доклинических исследованиях оценка отклонений основана преимущественно на выявлении статистически значимых различий между опытной и контрольной группами и значительно уступает клинически обоснованным подходам регистрации и интерпретации НЯ у здоровых добровольцев.

Обсуждение полученных результатов / Discussion of the results obtained

Интерпретация данных доклинических испытаний ЛС имеет принципиальное значение для обеспечения безопасности участников клинического этапа и возможности медицинского применения препарата. Сложность и неоднозначность оценки результатов доклинических исследований и корректность экстраполяции данных на человека обусловлены, в том числе, качественным и количественным разнообразием тестируемых систем, регистрируемых параметров и подходов к их интерпретации, а также статистических методов при определении возможного риска для человека [22]. Ряд вопросов в отношении интерпретации результатов доклинических исследований находит отражение в отдельных методических руководствах [8, 11]. Однако систематизированные критерии и/или универсальный алгоритм оценки полученных данных отсутствуют.

Формат изучения острой, подострой и хронической токсичности в ходе доклинических исследований предполагает многократное введение лекарственного средства в различных дозировках, что потенциально позволяет установить большое количество отклонений в состоянии различных органов и систем организма, а также затрагивает клинические аспекты качества, эффективности и безопасности препарата. Полученные данные позволяют скорректировать планирование процедур и оценок визитов исследования, методов используемой лабораторной и инструментальной диагностики субъектов исследования с учётом оценки результатов доклинических исследований с целью повысить качество организации клинического этапа разработки.

Также существует целый ряд методологических аспектов, которые должны учитываться при планировании и проведении доклинических исследований, так как они оказывают существенное влияние на получаемые результаты. В первую очередь это адекватность программы и дизайна экспериментальных исследований, а именно статистическая достоверность данных, релевантность экспериментальных моделей и тест-систем, адекватность оценочных критериев, сравнительный дизайн, адекватность выбора препарата сравнения и пр. Так, в частности, для повышения эффективности интерпретации результатов доклинических исследований необходимо включение достаточного количества лабораторных животных не только с учётом рекомендаций нормативно-методической документации и экономических соображений, но и применимым обоснованием объёма выборки с использованием статистических подходов к анализу данных с поправкой на концепцию сокращения использования лабораторных животных посредством реализации «принципов 3R» (Reduction – Refinement – Replacement, т. е. Сокращение – Улучшение – Замена), которая пользуется поддержкой со стороны регуляторных органов европейских стран [23].

Кроме того, важна единая система интерпретация выявленных отклонений в состоянии животных, в том числе по данным лабораторных и инструментальных исследований, основанная не только на сравнении с контрольной группой, что позволяет выявлять статистические различия, но и сопоставление с референтными интервалами, которые целесообразно устанавливать в каждом учреждении, проводящем доклинические исследования. Данный методологический аспект обусловлен тем обстоятельством, что описанные в научной литературе [24, 25] или в инструкциях по использованию реактивов диапазоны нормальных значений исследуемых параметров лабораторных животных, сформированы в результате обследования особей из различных питомников, на небольших объёмах выборки, а также без учёта исходной информации о методах получения данных и используемом аппаратурном обеспечении, что ставит под сомнение универсальность таких данных.

Таким образом, корректная оценка и интерпретация данных доклинических исследований определяет стратегию планирования клинического этапа разработки ЛС с учётом безопасности субъектов КИ, следовательно, целесообразно совершенствование подходов к оценке доклинических данных и систематизация имеющихся методов анализа.

Выводы / Conclusions

В ходе сравнительной оценки параметров безопасности и переносимости, полученных на доклиническом и клиническом этапах исследования лекарственного препарата Реамберин®, установлены однонаправленные отклонения от нормальных (контрольных) значений. Выявленные единичные случаи НЯ у добровольцев (повышение активности АСТ, изменения артериального давления) не соотносились с данными доклинического исследования, что связано как с методиками получения первичных данных, так и индивидуальными особенностями организма.

Количество сопоставляемых показателей у лабораторных животных, для которых были установлены статистически значимые различия между опытными и контрольными группами, значительно превышало численность признаков в виде НЯ у добровольцев. Полученные результаты, с большой вероятностью, связаны с методическими особенностями изучения подострой (хронической токсичности) у животных на этапе доклинического исследования. Для более объективного сопоставления данных доклинических и клинических исследований необходимы единые подходы к интерпретации полученных результатов. Широко используемая в доклинических исследованиях оценка отклонений, основанная преимущественно на выявлении статистически значимых различий между опытной и контрольной группами, значительно уступает клинически обоснованным подходам регистрации и интерпретации НЯ у здоровых добровольцев. Таким образом, при проведении доклинических исследований на первый план выходит необходимость стандартизации методов оценки параметров безопасности посредством внедрения процедур расчёта выборки лабораторных животных с учётом применимых статистических подходов к анализу данных, а также разработка референтных интервалов лабораторных показателей исследовательского центра.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ
ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторский коллектив заявляет об отсутствии конфликта интересов при подготовке данной статьи.

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

Благодарности. Авторский коллектив выражает благодарность ООО «НТФФ «ПОЛИСАН» за предоставление данных для написания настоящей публикации.

Acknowledgments. The team of authors would like to thank LLC «POLYSAN» for providing data for this publication.

Участие авторов. Василюк В. Б. — концепция исследования, редактирование статьи, написание статьи; Фарапонова М. В. — концепция исследования, редактирование статьи, написание статьи, расчёты; Сыраева Г. И. — концепция исследования, редактирование статьи, обзор литературы, написание статьи; Верведа А. Б., Бельская А. В., Шульц А. В., Кубарская Л. Г., Золотверхая Е. А. — редактирование статьи, обзор литературы, написание статьи, расчёты.

Participation of authors. Vasilyuk VB — research concept, article editing, article writing; Faraponova MV — research concept, article editing, article writing, calculations; Syraeva GI — research concept, article editing, literature review, article writing; Verveda AB, Belskaya AV, Shults AV, Kubarskaya LG, Zolotverkhaya EA — article editing, literature review, article writing, calculations.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Василюк Василий Богданович
e-mail: vasilyuk_vb@ecosafety.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2503-4402
SPIN-код: 1459-5548
д. м. н., профессор кафедры токсикологии, экстремальной и водолазной медицины ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия; управляющий ООО «НИЦ Эко-безопасность», Санкт-Петербург, Россия

Vasilyuk Vasiliy B.
e-mail: vasilyuk_vb@ecosafety.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2503-4402
SPIN code: 1459-5548
Dr. Sci. (Med.), professor of the Department of Toxicology, Extreme and Diving Medicine North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia; Managing the Limited Liability Company «Research center Eco-safety», Saint-Petersburg, Russia

Фарапонова Мария Валерьевна
e-mail: faraponova_mv@ecosafety.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4212-5453
SPIN-код: 9006-2074
заместитель управляющего по научной работе ООО «НИЦ Эко-безопасность», Санкт-Петербург, Россия

Faraponova Maria V.
e-mail: faraponova_mv@ecosafety.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4212-5453
SPIN code: 9006-2074
Deputy Manager for Scientifi c Work the Limited Liability Company «Research center Eco-safety», Saint-Petersburg, Russia

Сыраева Гульнара Ислямовна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: syraevagulnara@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6635-9786
SPIN-код: 9650-5671
заместитель управляющего по качеству ООО «НИЦ Эко-безопасность», Россия, Санкт-Петербург; очный аспирант кафедры клинической фармакологии и доказательной медицины, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Syraeva Gulnara I.
Corresponding author
e-mail: syraevagulnara@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6635-9786
SPIN code: 9650-5671
Deputy Quality Manager, LLC «Eco-safety Research Center», Saint-Petersburg, Russia; full-time postgraduate student of the Department of Clinical Pharmacology and Evidence-based Medicine FSBEI HE I. P. Pavlov SPbSMU MOH Russia, Saint-Petersburg, Russia

Верведа Алексей Борисович
e-mail: aleksivan02@rambler.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4029-3170
SPIN-код: 5448-0433
к. м. н, в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия; с. н. с., научно-исследовательского отдела ООО «НИЦ Эко-безопасность», Санкт-Петербург, Россия

Verveda Aleksey B.
e-mail: aleksivan02@rambler.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4029-3170
SPIN code: 5448-0433
PhD, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Drug Toxicology, Golikov Research Center of Toxicology Saint-Petersburg, Russia; Senior Researcher of Scientifi c Work the Limited Liability Company «Research center Eco-safety», Saint-Petersburg, Russia

Бельская Алиса Владимировна
e-mail: belskayaalisa@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9343-4144
SPIN-код: 9233-1240
н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Belskaya Alisa V.
e-mail: belskayaalisa@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9343-4144
SPIN code: 9233-1240
Researcher, Laboratory of Drug Toxicology, Golikov Research Center of Toxicology, Saint-Petersburg, Russia

Шульц Алёна Викторовна
e-mail: shults.alena24@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9809-0678
м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Shults Alena V.
e-mail: shults.alena24@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9809-0678
Junior Researcher, Laboratory of Drug Toxicology, Golikov Research Center of Toxicology, Saint-Petersburg, Russia

Кубарская Лариса Георгиевна
e-mail: larkub@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7622-0390
SPIN-код: 9596-7227
к. б. н., с. н. с. лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия; ведущий инженер лаборатории химии и фармакологии лекарственных средств отдела нейрофармакологии, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

Kubarskaya Larisa G.
e-mail: larkub@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7622-0390
SPIN code: 9596-7227
PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of biochemical toxicology and pharmacology, Golikov Research Center of Toxicology, Saint-Petersburg, Russia; Lead Engineer, Laboratory of chemistry and pharmacology of medicines, Department of Neuropharmacology, FSBSI «IEM» (Federal State Budgetary Institution «Institute of Experimental Medicine»), Saint-Petersburg, Russia

Золотоверхая Екатерина Андреевна
e-mail: orzheskovskaya@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9708-2596
SPIN-код: 8138-1497
к. б. н., в. н. с. лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Zolotoverkhaya Ekaterina A.
e-mail: orzheskovskaya@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9708-2596
SPIN code: 8138-1497
PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory of biochemical toxicology and pharmacology, Golikov Research Center of Toxicology, Saint-Petersburg, Russia

Список литературы / References

1. Наркевич И.А., Немятых О.Д., Басакина И.И., Сиукаева Д.Д. Фармацевтическая разработка лекарственных препаратов для педиатрической практики: фундаментальные основы и специфические особенности. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;16(3):194–201. [Narkevich IA, Nemyatykh OD, Basakina II, Siukaeva DD. Pharmaceutical development of drugs for pediatric practice: fundamental bases and specific features. *Drug development & registration*. 2016;3(16): 194–201. (In Russ).].

2. ГОСТ Р 56699-2015 от 1 июля 2016. «Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации». [GOST R 56699-2015 of 1st July 2016. «Lekarstvennye sredstva dlya medicinskogo primeneniya. Doklinicheskie issledovaniya bezopasnosti biotekhnologicheskih lekarstvennyh preparatov. Obshchie rekomendacii». (In Russ).]. URL: https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293758/4293758351.pdf. Ссылка активна на 11.07.2022.

3. Ich.org [Internet]. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Available from: [cited 2022 Jul 11] https://www.ich.org/

4. Хельсинкская декларация всемирной медицинской ассоциации. [World medical association declaration of Helsinki (In Russ).]. URL: https://www.asmu.ru/upload/iblock/067.pdf Ссылка активна на 11.07.2022.

5. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26 ноября 2019 г. № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов». [Reshenie Kollegii Evrazijskoj ekonomicheskoj komissii of 26 November 2019 № 202 "Ob utverzhdenii Rukovodstva po doklinicheskim issledovaniyam bezopasnosti v celyah provedeniya klinicheskih issledovanij i registracii lekarstvennyh preparatov"]. URL: https://www.alta.ru/tamdoc/19kr0202. Ссылка активна на 11.07.2022.

6. ГОСТ Р 56701-2015. «Национальный стандарт Российской Федерации. Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств». [GOST R 56701-2015. Nacional'nyj standart Rossijskoj Federacii. Lekarstvennye sredstva dlya medicinskogo primeneniya. Rukovodstvo po planirovaniyu doklinicheskih issledovanij bezopasnosti s cel'yu posleduyushchego provedeniya klinicheskih issledovanij i registracii lekarstvennyh sredstv" (In Russ).]. URL: https://www.alta.ru/tamdoc/19kr0202. Ссылка активна на 11.07.2022

7. Ema.europa.eu [Internet]. Concept paper on the Need for Revision of the note for Guidance on Photosafety testing (CPMP/SWP/398/01), EMEA/CHMP/ SWP/ 534549/2007; January 2008 [cited 2022 Jul 11]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/concept-paper-need-revision-note-guidance-photosafety-testing_en.pdf

8. Ema.europa.eu [Internet]. Concept paper on the Need for Revision of the Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products (CPMP/SWP/2145/00), EMA/CHMP/ SWP/708666/2010; July 2011 [cited 2022 Jul 11]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/concept-paper-need-revision-guideline-non-clinical-local-tolerance-testing-medicinal-products_en.pdf

9. Ema.europa.eu [Internet]. ICH S2(R1) Guidance on Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use; November 2011 2011 [cited 2022 Jul 11]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/ich-s2-r1-genotoxicity-testing-data-interpretation-pharmaceuticals-intended-human-use

10. Guidance for Industry. Assessment of Abuse Potential of Drugs. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); January 2010

11. Ema.europa.eu [Internet]. Overview of comments received on draft guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of human pharmaceuticals for paediatric indications Doc. ref. EMEA/425007/2007; May 2009 [cited 2022 Jul 11]. Available from:https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/overview-comments-received-draft-guideline-need-non-clinical-testing-juvenile-animals-human_en.pdf

12. Ema.europa.eu [Internet]. The International Conference on Harmonisation. Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (ICH M3(R2)). 2009 [cited 2022 Jul 11]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m3r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-marketing-authorisation_en.pdf

13. Ema.europa.eu [Internet]. The International Conference on Harmonisation. Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals (ICH S6(R1)). 2011 [cited 2022 Jul 11]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-s6r1-preclinical-safety-evaluation-biotechnology-derived-pharmaceuticals-step-5_en.pdf

14. Вольская Е. Модернизация управления сферой клинических исследований в Евросоюзе. *Ремедиум*. 2015;6–14. [Volskaya E. Reformation of clinical trials management in the EU. *Remedium*. 2015:6–14 (In Russ).].

15. Сыраева Г.И., Колбин А.С., Матвеев А.В. Панежина В.С а. Сравнительный обзор методологий оценки стоимости нежелательных лекарственных реакций в Российской Федерации и Бразилии. *Фармация и фармакология*. 2020;8(5):336–344. [Syraeva GI, Kolbin AS, Matveev AV, Panezhina VS. Comparative review of methodologies for estimating the cost of adverse drug reactions in the Russian Federation and Brazil. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(5):336–344. (In Russ).]. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-5-336-344

16. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 г. № 51 об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). [Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated 29.08.2014 No. 51 on approval of SP 2.2.1.3218-14 «Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya k ustrojstvu, oborudovaniyu i soderzhaniyu eksperimental'no-biologicheskih klinik (vivariev). (In Russ).]. URL: https://34.rospotrebnadzor.ru/content/282/6555. Ссылка активна на 11.07.2022.

17. Европейская конвенция по защите позвоночных животных. Страсбург, 1986 г. [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals. (In Russ).]. URL: https://www.academpharm.ru/images/upload/ru/1241/evropeskaya_konvenciya_ETS123.pdf Ссылка активна на 11.07.2022.

18. ГОСТ Р 53434-2009 Национальный стандарт Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики». [GOST R 53434-2009 National standard of the Russian Federation «Principy nadlezhashchej laboratornoj praktiki» (In Russ).]. URL: https://meganorm.ru/Data/486/48600.pdf Ссылка активна на 11.07.2022.

19. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики». [Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation No. 708n dated August 23, 2010 «Ob utverzhdenii pravil laboratornoj praktiki» (In Russ).]. URL: https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/12079613. Ссылка активна на 11.07.2022.

20. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 944 с. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv / Ed by AN Mironova. Chast' pervaya. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ).].

21. Отчет о результатах клинического исследования по теме: «Открытое, рандомизированное исследование безопасности, переносимости препарата Реамберин®, 1,5%, раствор для инфузий (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН») при однократном внутривенном инфузионном введении препарата в различных дозировках и с различной скоростью здоровым добровольцам, и фармакокинетики препарата Реамберин®, 1,5%, раствор для инфузий (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН») при однократном внутривенном инфузионном введении препарата объемом 2000 мл со скоростью 10 мл/мин у здоровых добровольцев», Санкт-Петербург, 2019. [Otchet o rezul'tatah klinicheskogo issledovaniya po teme: «Otkrytoe, randomizirovannoe issledovanie bezopasnosti, perenosimosti preparata Reamberin®, 1,5%, rastvor dlya infuzij (OOO «NTFF «POLISAN») pri odnokratnom vnutrivennom infuzionnom vvedenii preparata v razlichnyh dozirovkah i s razlichnoj skorost'yu zdorovym dobrovol'cam, i farmakokinetiki preparata Reamberin®, 1,5%, rastvor dlya infuzij (OOO «NTFF «POLISAN») pri odnokratnom vnutrivennom infuzionnom vvedenii preparata ob'emom 2000 ml so skorost'yu 10 ml/min u zdorovyh dobrovol'cev», Saint-Petersburg, 2019. (In Russ).].

22. Енгалычева Г.Н., Сюбаев Р.Д., Меркулов В.А., Васильев А.Н. Анализ результатов доклинических исследований безопасности лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(2):9–11. [Yengalycheva GN, Syubaev RD, Merkulov VA, Vasilyev AN. Evaluating the results of drug preclinical safety studies. *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya*. 2013;(2):9–11. (In Russ).].

23. Ema.europa.eu [Internet]. Concept paper on the Need for Revision of the Position on the Replacement of Animal Studies by *in vitro* Models (CPMP/SWP/728/95), EMA/CHMP/ SWP/169839/2011; March 2011 [cited 2022 Jul 11]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/revised-concept-paper-need-revision-position-replacement-animal-studies-vitro-models_en.pdf

24. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Проблема нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы) / под ред. И.М. Трахтенберга. М.: Медицина; 1991. 208 с [Trahtenberg IM, Sova RE, SHeftel' VO, Onikienko FA. Problema normy v toksikologii (sovremennye predstavleniya i metodicheskie podhody, osnovnye parametry i konstanty) / Ed by IM Trahtenberg. Moscow: Medicina; 1991. (In Russ).].

25. Абрашова Т.В., Гущин Я.А., Ковалева М.А., Рыбакова А.В., Селезнева А.И., Соколова А.П., Ходько С.В. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / под ред. Макарова В.Г., Макаровой М.Н. СПб.: Изд-во «ЛЕМА», 2013 [Abrashova TV, Gushchin YaA, Kovaleva MA, Rybakova AV, Selezneva AI, Sokolova AP, Hod'ko SV. Spravochnik. Fiziologicheskie, biohimicheskie i biometricheskie pokazateli normy eksperimental'nyh zhivotnyh / Ed by Makarova VG, Makarovoj MN. Saint-Petersburg; 2013. (In Russ).].

Харкевичу Дмитрию Александровичу

к 95-летию со дня рождения

От редакции

30 октября 2022 г. исполняется 95 лет со дня рождения выдающегося учёного, академика РАН *Дмитрия Александровича Харкевича*, в течение многих десятилетий определяющего пути развития отечественной фармакологии, а также подготовку врачебных кадров в медицинских вузах страны в области лекарствоведения. *Дмитрий Александрович* встречает свой юбилей, продолжая активно работать на кафедре фармакологии лечебного факультета Сеченовского университета, которой он отдал 60 лет жизни, сформировав принципы преподавания этой дисциплины, сохраняющие свою значимость и в меняющихся условиях современной жизни.

Научная деятельность

Значительная часть научных исследований *Д. А. Харкевича* посвящена фармакологии вегетативных ганглиев. Он использовал различные экспериментальные методы, в том числе электрофизиологические, исследовал десятки оригинальных химических соединений, созданных химиками, работавшими в Институте фармакологии и химиотерапии АМН СССР.

Важно отметить, что *Дмитрий Александрович* изучал механизм и локализацию действия этих веществ, что вызывало не только теоретический интерес, но и стало основой для направленного синтеза новых ганглиоблокирующих средств. Полученные результаты позволили сформулировать общие принципы действия указанных средств на передачу возбуждения в вегетативных ганглиях, а также расширить представления о закономерностях синаптической передачи. Обнаруженные закономерности «структура – действие» стали предпосылкой для создания ганглиоблокаторов с заданными свойствами. Один из таких препаратов – гигроний – обладает непродолжительным действием и, в отличие от зарубежного арфонда, – меньшей токсичностью. Успешно проведены клинические исследования этого лекарственного средства и принято положительное решение о его медицинском применении. Приоритет создания гигрония подтверждён авторскими свидетельствами и патентами. *Д. А. Харкевич* обобщил результаты указанных работ в монографии «Ганглионарные средства», изданной в 1962 г., а затем в книге «Ganglion-blocking and gangloin-stimulating agents», опубликованной в Великобритании. Спустя несколько лет *Дмитрий Александрович* в качестве титульного редактора и автора в содружестве с отечественными и иностранными исследователями выпустил в серии «Handbook of Experimental Pharmacology» руководство, посвящённое фармакологии и ганглионарной передаче, теоретическая и практическая значимость которого сохранилась до сих пор.

Д. А. Харкевич является одним из первых исследователей, показавших возможность избирательной фармакологической блокады м-холинорецепторов сердца (диазолином, диадонием, анатруксонием).

Под руководством *Д. А. Харкевича* на кафедре фармакологии проводились исследования фармакологии афферентных систем. Изучено влияние препаратов разных групп (психотропные средства, средства для наркоза, холино- и адренотропные вещества) на межнейронное проведение возбуждения на разных уровнях спино-кортикальных путей.

Установлено, что антиноцептивный эффект м-холиномиметиков и антихолинэстеразных средств связан с действием на синаптическую передачу в спинном мозге.

Особое внимание *Д. А. Харкевич* и его сотрудники уделяли исследованиям наркотических анальгетиков и опиодных пептидов. Изучено большое количество оригинальных лигандов опиоидных рецепторов, выявлены закономерности «структура – действие», а также их эффекты при комбинированном применении с другими лекарственными средствами других групп.

В течение ряда лет на кафедре проводились работы, связанные с изучением влияния лекарственных средств на коронарное кровообращение и системную гемодинамику, противовоспалительных свойств ряда веществ растительного происхождения, а также исследовано действие на разные изоформы циклооксигеназы.

Дмитрий Александрович и его сотрудники неоднократно выступали с научными докладами на различных конгрессах, симпозиумах, съездах как в нашей стране, так и за рубежом. Результаты всех перечисленных работ имеют приоритетное значение, а за создание новых лекарственных препаратов *Д. А. Харкевич* получил 19 авторских свидетельств и 10 зарубежных патентов (Франция, Швейцария, США, Великобритания, Япония). Он опубликовал более 250 научных работ и 9 монографий, отмечен премиями им. Н.П. Кравкова (1971) и В.В. Закусова (1991) АМН СССР. В 1967 г. избран член-корреспондентом, в 1984 г. – академиком АМН СССР, с 1998 г. – заслуженный деятель науки Российской Федерации, с 2013 г. – академик РАН.

Таким образом, изложенные данные свидетельствуют о выдающемся вкладе *Дмитрия Александровича* в развитие как медицинской науки, так и практического здравоохранения.

Педагогическая деятельность

Роль *Д. А. Харкевича* как руководителя учебно-методической работы кафедры фармакологии настолько велика, что простое перечисление его заслуг в деле подготовки врачебных кадров кажется неуместным: требуется использование слов «впервые», «выдающийся» и т. д. Тем не менее, *Дмитрий Александрович* сформировал чёткие подходы к преподаванию фармакологии как на этапе лабораторных занятий, так и в лекционном курсе.

Д. А. Харкевич написал учебник «Фармакология» для медицинских вузов, впервые ставший доступным в 1980 г. Этот учебник к 2017 г. выдержал 12 изданий, что является беспрецедентным событием, он остаётся основным при изучении фармакологии не только в нашей стране, но и во многих республиках бывшего СССР. Учебник переведён на 6 иностранных языков, в том числе, на английский язык. Каждое новое издание учебника «Фармакология» отличается от предыдущей тщательной переработкой, дополнениями, связанными с новыми тенденциями в фармакологии. Многие поколения врачей разных специальностей получили подготовку по фармакологии благодаря учебнику *Дмитрия Александровича*. Ведущие профессора Сеченовского университета, работающие на клинических кафедрах, готовясь к лекциям, обращаются к «Фармакологии» *Д. А. Харкевича* для того, чтобы их встречи со студентами в разделе «Лечение» соответствовали современным представлениям о принципах действия лекарственных средств.

Подготовка научно-педагогических кадров и научно-организационная деятельность

Д. А. Харкевич подготовил 6 докторов и 34 кандидата медицинских наук. В течение ряда лет *Д. А. Харкевич* являлся членом исполкома Международного союза фармакологов и Европейского союза фармакологов, руководил научно-координационным советом АМН СССР, являлся членом Президиума РАМН, членом Учёного медицинского совета Минздрава, председателем Московского научного общества фармакологов, входит в состав редколлегий ряда отечественных и зарубежных научных изданий. Свыше 15 лет *Дмитрий Александрович* был президентом Российского научного общества фармакологов, более 25 лет – главным редактором журнала «Экспериментальная и клиническая фармакология». Успешно руководил отделом фармакологии Большой медицинской энциклопедии, Диссертационным учёным советом. *Д. А. Харкевич* – Заслуженный профессор и Почётный заведующий кафедрой фармакологии лечебного факультета Сеченовского университета, Почётный доктор Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, Почётный президент Российского научного общества фармакологов, обладатель ряда дипломов и медалей ВДНХ.

Дмитрий Александрович продолжает свою профессиональную деятельность в качестве Почётного Заведующего кафедрой фармакологии лечебного факультета Сеченовского университета. Пожелаем же *Дмитрию Александровичу Харкевичу* здоровья, бодрости и оптимизма.

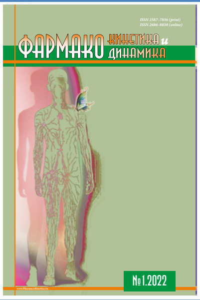
Редколлегия журнала
«Фармакокинетика и фармакодинамика»

Издательство
ОКИ

ООО «Издательство ОКИ» выпускает 4 периодических научных специализированных медико-фармацевтических журналов, предназначенных для врачей, провизоров, фармацевтов, специалистов НИИ, преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов, организаторов здравоохранения, клинических исследователей, фармакологов, сотрудников фармацевтических компаний, служащих регулирующих органов, членов Комитетов по Этике.
Сайт издательства: www.izdat-oki.ru

Журнал **«Качественная клиническая практика»** публикует материалы по планированию и проведению клинических исследований лекарственных средств, фармакоэкономике, фармакоэпидемиологии, биомедицинской этике, фармаконадзору, которые используются в преподавательской работе во многих медицинских ВУЗах.

Сайт журнала: www.clinvest.ru



Журнал **«Фармакокинетика и Фармакодинамика»** освещает фундаментальные и прикладные аспекты доклинических и клинических исследований фармакокинетики, в частности терапевтического лекарственного мониторинга, фармакодинамического и биофармацевтического изучения препаратов, их взаимодействия, оценки их биодоступности и биоэквивалентности.
Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru

Журнал **«Фармакогенетика и фармакогеномика»** публикует оригинальные статьи о проведённых клинических, клинико-экспериментальных и фундаментальных научных работах, обзоры, лекции, описания клинических случаев,
а также вспомогательные материалы по всем актуальным проблемам персонализированной медицины

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru

Журнал **«Антибиотики и химиотерапия»** освещает проблемы поиска и получения новых антибиотиков, ферментов, биологически активных веществ, а также вопросы экспериментальной химиотерапии бактериальных и вирусных инфекций.

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

Журнал **«Реальная клиническая практика: данные и доказательства»** ставит своей целью предоставить средство для распространения и форум для обсуждения информации о том, как лекарственные препараты действуют в рутинной медицинской практике. Рубрики журнала включают как оригинальные исследования, так и обзоры использования реальных данных для оценки исходов лечения, принятия обоснованных медицинских решений в отношении лекарственных препаратов, медицинских изделий и других вмешательств.

Тел.: +7 (910) 449-22-73 ▪ e-mail: clinvest@mail.ru

Центр Фармакоэкономических Исследований

CLINVEST@MAIL.RU

www.HealthEconomics.ru

21	230+	220+	40
Год 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 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 (926) 568-17-35
clinvest@mail.ru

Чеберда Алексей Евгеньевич
Исполнительный директор
+ 7 (963) 999-77-69
aecheberda@healtheconomics.ru

Афанасьева Елена Владимировна
Финансовый директор
+ 7 (916) 986-04-65
eva88@list.ru