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

ФАРМАКОКИНЕТИКА и ДИНАМИКА

Включен в перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ

№4.2022

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

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№4
2022

Издательство
ОКИ

Главный редактор
Жердев Владимир Павлович
д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора
Смирнов Валерий Валерьевич
д. фарм. н., Москва

Ответственный секретарь
Литвин Александр Алексеевич
д. б. н., Москва

Редакционная коллегия

Бондарева Ирина Борисовна
д. б. н., Москва

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

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

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

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

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

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

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

Мирошниченко Игорь Иванович
д. м. н., Москва

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

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

Сариев Абрек Куангалиевич
д. м. н., профессор, Москва

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

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

Сычёв Дмитрий Алексеевич
академик РАН, д. м. н., профессор, Москва

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

Хохлов Александр Леонидович
академик РАН, д. м. н., профессор, Ярославль

Выпускающая группа

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

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

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

Подписано в печать 24.12.2022 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 Е45072**

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.

Сайты	Журналы
www.Antibiotics-Chemotherapy.ru	Антибиотики и Химиотерапия
www.ClinVest.ru	Качественная клиническая практика
www.MyRWD.ru	Реальная клиническая практика: данные и доказательства
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru	Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru	Центр Фармакоэкономических Исследований
www.izdat-Oki	Издательство ОКИ

СОДЕРЖАНИЕ

АКТУАЛЬНЫЕ ОБЗОРЫ

Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 4. Блокаторы и модуляторы калиевых hERG-каналов
Мокров Г. В. 3

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Влияние анксиолитика фабомотизола на временные параметры деполяризации предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда
Смирнова С. Л., Рощевская И. М., Цорин И. Б., Крыжановский С. А. 20

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Количественное определение содержания венлафаксина и его активного метаболита в плазме крови человека посредством хроматомасс-спектрометрии
Кузьмин И. И., Платова А. И., Константинова А. С., Мирошниченко И. И. 26

Количественное определение моноаминовых нейротрансмиттеров в гомогенатах головного мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС посредством хроматомасс-спектрометрии
Попов Н. С., Гавриленко Д. А., Балабаньян В. Ю., Петрова М. Б., Донсков СА., Атаджанов И. Б., Шатохина Н. А.. 33

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Проявление патогномоничных признаков при моделировании сахарного диабета стрептозотоцином у мышей BALB/c
Сорокина А. В., Жанатаев А. К., Чайка З. В., Мирошкина И. В., Лисицын А. А., Дурнев А. Д. 43

Исследование взаимодействия дипептидного миметика нейротрофина BDNF ГСБ-106 с тирозинкиназным рецептором TrkB с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса
Тарасюк А. В., Мезенцев Ю. В., Гнеденко О. В., Поварнина П. Ю., Иванов А. С. 50

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Оценка фармакологической безопасности нового дипептидного миметика 2-й петли BDNF при совместном введении с этанолом
Надорова А. В., Григоревских Е. М., Тарасюк А. В., Сазонова Н. М., Колик Л. Г. 55

ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности препарата Телзап® по сравнению с препаратом Микардис® у здоровых добровольцев после однократного приёма
Хохлов А. Л., Хохлов А. А., Мирошников А. Е., Лебедева О. В., Гребенкин Д. Ю. 62

Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности двухкомпонентного препарата Телзап® Плюс по сравнению с МикардисПлюс® с участием здоровых добровольцев после однократного приёма
Хохлов А. Л., Хохлов А. А., Мирошников А. Е., Лебедева О. В., Гребенкин Д. Ю. 69

СОДЕРЖАНИЕ

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№4
2022

Издательство
ОКИ

Chief editor
Zherdev Vladimir
Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor
Smirnov Valery
Ph.D., Moscow

Executive secretary
Litvin Alexander
Ph.D., Moscow

EDITORIAL BOARD

Bondareva Irina
Ph.D., Moscow

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

Gromova Olga
Ph.D., Professor, Ivanovo

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

Kovalev Georgy
Ph.D., Professor, Moscow

Colic Larisa
Ph.D., Professor, Moscow

Kolyvanov Gennady
Ph.D., Moscow

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

Miroshnichenko Igor
Ph.D., Moscow

Rudakova Alla
Ph.D., Professor, St. Petersburg

Ramenskaya Galina
Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek
Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander
Academician RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Starodubtcev Alex
Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry
Academician RAS, Ph.D., Professor, Moscow

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

Khokhlov Alexander
Academician RAS, Ph.D., Professor, Yaroslavl

ISSUING GROUP

Belousov Dmitry
Managing Editor
+7(910)449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

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

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

Signed in print 24.12.2022 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.

Sites	Journals
www.Antibiotics-Chemotherapy.ru	Antibiotics and Chemotherapy
www.ClinVest.ru	Good Clinical Practice
www.MyRWD.ru	Real-World Data & Evidence
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru	Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru	Center of Pharmacoeconomics Research
www.izdat-Oki.ru	Publisher OKI

CONTENTS

REVIEWS

Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 4. Potassium hERG channels blockers and modulators
Mokrov GV 3

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Effect of the anxiolytic fabomotizol on the time parameters of atrial depolarization in the acute phase of myocardial infarction
Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA 20

DRUGS DETERMINATION METHODS

Quantitative determination of the content of venlafaxine and its active metabolite in human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry
Kuzmin II, Platova AI, Konstantinova AS, Miroshnichenko II 26

Quantitative determination of monoamine neurotransmitters in rat brain homogenates using HPLC-MS/MS
Popov NS, Gavrilenko DA, Balabanyan VYu, Petrova MB, Donskov SA, Atadzhanov IB, Shatokhina NA 33

DRUG ACTION STUDIES

Manifestation of pathognomonic signs in modeling diabetes mellitus with streptozotocin in BALB/c micer
Sorokina AV, Zhanataev AK, Chayka ZV, Miroshkina IA, Lisitsyn AA, Durnev AD 43

Study of the interaction of the GSB-106 BDNF neurotrophin dipeptide mimetic with the TrkB tyrosine kinase receptor using surface plasmon resonance technology
Tarasiuk AV, Mezentsev YV, Gnedenko OV, Povarnina PYu, Ivanov AS 50

PRECLINICAL AND CLINICAL STUDIES OF DRUG SAFETY

Assessment of pharmacological safety of a new dipeptide mimetic of the 2nd loop of BDNF when co-administered with ethanole
Nadorova AV, Grigorevskikh EM, Tarasiuk AV, Sazonova NM, Kolik LG 55

BIOEQUIVALENCE STUDIES

Pharmacokinetic and bioequivalence study of Telzap® in comparison with Mikardis® in healthy subjects after single administration
Khokhlov AL, Khokhlov AA, Miroshnikov AE, Lebedeva OV, Grebenkin DYu 62

Pharmacokinetic and bioequivalence study of Telzap® Plus fixed-dose combination compared with MikardisPlus® in healthy volunteers after single administration
Khokhlov AL, Khokhlov AA, Miroshnikov AE, Lebedeva OV, Grebenkin DYu 69

CONTENTS

Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 4. Блокаторы и модуляторы калиевых hERG-каналов

Мокров Г. В.

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

Аннотация. Калиевый канал hERG-подтипа (Kv11.1) является одной из важнейших и одной из наиболее изученных биологических мишеней для создания кардиопротекторных средств. В ряду биароматических соединений описано большое количество как блокаторов, так и активаторов/модуляторов hERG-канала. Вещества с hERG-механизмом используются прежде всего для эффективной регуляции длительности потенциала действия в тканях сердца и контроля интервала QT на электрокардиограмме. В ряду блокаторов hERG наиболее известным препаратом является дофетилид, который используется для поддержания синусового ритма при мерцательной аритмии. В обзоре рассмотрены все известные на сегодняшний день лиганды hERG-канала с биароматической структурой и данные об их биологических свойствах.

Ключевые слова: антиаритмики; кардиопротекторы; блокаторы hERG-каналов; активаторы/модуляторы hERG-каналов; биароматические соединения

Для цитирования:
Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 4. Блокаторы и модуляторы калиевых hERG-каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(4):3–19. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-3-19
Поступила: 21 октября 2022 г. **Принята:** 09 ноября 2022 г. **Опубликована:** 24 декабря 2022 г.

Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 4. Potassium hERG channels blockers and modulators

Mokrov GV

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

Abstract. The hERG subtype potassium channel (Kv11.1) is one of the most important and one of the most studied biological targets for the creation of cardioprotective agents. A large number of both blockers and activators/modulators of the hERG channel have been described with biaromatic structure. Substances with an hERG-mechanism are used primarily for the effective regulation of the action potential duration in the heart tissues and for the control of the QT interval on the electrocardiogram. Among the hERG blockers, the most well-known drug is dofetilide, which is used to maintain sinus rhythm in atrial fibrillation. The review presents all currently known ligands of the hERG channel with a biaromatic structure and the data on their biological properties.

Keywords: antiarrhythmics; cardioprotectors; hERG channel blockers; hERG channel activators/modulators; biaromatic compounds

For citations:
Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 4. Potassium hERG channels blockers and modulators. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(4):3–19. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-3-19
Received: October 21, 2022. **Accepted:** November 09, 2022. **Published:** December 24, 2022.

Список сокращений / List of abbreviations

Cavx.y	Потенциал-зависимые кальциевые каналы, изоформа x.y
CHO	Клетки яичника китайского хомячка
EC	Эффективная концентрация
HCN	Циклически-нуклеотид-управляемый канал, активируемый гиперполяризацией
hERG	Канал, кодируемы геном «human ether-a-go-go-related gene»
IC_{50}	Полумаксимальная ингибирующая концентрация
I_{CaL}	Кальциевый ток L-типа
I_K	Калиевый ток задержанного выпрямления
I_{K1}	Калиевый ток аномального выпрямления
I_{KATP}	АТФ-чувствительный калиевый ток
I_{Kr}	Быстрый калиевый ток задержанного выпрямления
I_{Ks}	Медленный калиевый ток задержанного выпрямления
I_{to}	Транзиторный внешний калиевый ток
Kvx.y	Потенциал-зависимый калиевый канал, изоформа x.y
QSAR	Количественная связь структура-активность

Введение / Introduction

В сердце имеются многочисленные и разнообразные типы K^+-каналов, каждый из которых обладает особыми кинетическими и потенциал-зависимыми свойствами. Эти каналы вносят множество различных вкладов в сердечные токи, каждый из которых играет определённую роль на разных фазах реполяризации. Вместе они определяют относительно длительный, но точно настроенный временной ход реполяризации и резерв реполяризации после восстановления мембранного потенциала покоя. Резерв реполяризации относится к частично перекрывающейся функции этих токов, что придаёт системе ограниченный уровень избыточности. Кинетика реполяризации сильно различается в зависимости от области сердца и вида.

Это отражает различия в встречаемости и плотности различных подтипов каналов K^+. Все эти характеристики делают K^+-каналы важной группой фармакологических мишеней для кардиопротекторных препаратов [1–3].

Среди биароматических соединений с линейным линкером (БСЛ) имеется большое количество блокаторов/модуляторов калиевых каналов, которые относятся преимущественно к следующим наиболее изученным подтипам: hERG (Kv11.1) и Kv1.5 [4, 5].

Целью настоящего обзора является анализ данных литературы по блокаторам и модуляторам hERG-канала с кардиопротекторными свойствами в ряду соединений с биароматической структурой. Этот обзор является продолжением серии работ по анализу каридопротекторных свойств в группе биароматических соединений. Ранее были рассмотрены блокаторы кальциевых каналов [6], HCN-каналов [7] и натриевых каналов [8].

hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene) – это ген (*KCNH2*), который кодирует белок, известный как Kv11.1, альфа-субъединицу калиевого ионного канала. Этот ионный канал (иногда просто обозначаемый как "hERG") наиболее известен своим вкладом в электрическую активность сердца: канал hERG опосредует реполяризующий ток I_{Kr} в потенциале сердечного действия, который обладает координирующим влиянием на частоту сердечного ритма [9].

I_{Kr} вносит большой вклад в фазу реполяризации сердечного потенциала действия (ПД), эффективно контролируя длительность ПД (ДПД) и интервал QT, наблюдаемый на электрокардиограммах (ЭКГ). Эта сердечная функция hERG является свойством его уникальных характеристик ворот: подобно другим чувствительным к напряжению K^+ каналам, hERG открывается после деполяризации мембраны в результате зависимых от напряжения ответов его сенсорного домена напряжения; однако канал почти сразу инактивируется, ограничивая прохождение K^+ до начала фазы реполяризации ПД. В дополнение к быстрому началу и восстановлению после инактивации hERG деактивируется очень медленно, так что внешний K^+-ток проходит даже тогда, когда мембранный потенциал возвращается к потенциалу покоя. Это значимо поддерживает эффективную реполяризацию ПД сердца. Кинетика ворот hERG также позволяет каналу генерировать быстрые транзиторные токи в конце реполяризации ПД/начале диастолы для защиты от аритмогенной преждевременной деполяризации. Кроме того, кинетика дезактивации канала позволяет IKr влиять на диастолическую деполяризацию пейсмейкерных клеток [10].

Блокаторы каналов hERG исторически относятся к III классу антиаритмических средств по классификации Vaughan Williams и к IIIa классу по современной классификации *Lei M* [11]. Многие из них уже много лет используются в качестве кардиопротекторных средств. В серии БСЛ создано значительное количество блокаторов каналов hERG.

Дофетилид и его аналоги / Dofetilide and its analogues

В 1987 г. исследователи из Pfizer Central Research (Великобритания) запатентовали группу бис(арилалкил) аминов **1**, содержащих *n*-метилсульфониламидную группу по крайней мере в одном из ароматических колец (рис. 1). Эта группа была получена при поиске антиаритмических средств III класса в ряду производных соталола [12]. Соединения новой группы удлиняли ПД сердца без существенного изменения максимальной скорости деполяризации. Было обнаружено, что особенно предпочтительным структурным признаком является наличие метансульфонамидного фрагмента в обоих арильных кольцах. Среди этих соединений наиболее активным оказалось соединение **дофителид** с линейным линкером длиной 7 связей, содержащим атомы азота и кислорода. Замена атома кислорода в линкере на атом серы или метиленовое звено не оказывало существенного влияния на активность, но увеличение длины цепи приводило к её снижению.

В изолированных папиллярных мышцах морских свинок дофителид вызывал дозозависимое удлинение эффективного рефрактерного периода (ЭРП) при концентрации от 5×10^{-9} М и выше. В экспериментах с локальной фиксацией напряжения с использованием отдельных миоцитов желудочка морской свинки (метод цельноклеточного пэтч-кламп) дофителид уменьшал амплитуду зависящего от времени K^+-тока (I_K) без снижения независимых от времени фоновых токов (I_{K1}). В диапазоне от 1 до 100 мкг/кг внутривенно дофителид в зависимости от дозы повышал как предсердный, так и желудочковый ЭРП у собак, анестезированных фенобарбиталом. Пролонгация ЭРП в предсердиях была больше, чем в желудочках, хотя минимальные эффективные дозы были одинаковыми в каждой ткани [13]. При измерении методом пэтч-кламп на клетках HEK293 дофетилид блокировал каналы hERG с IC_{50} 7 нМ при 37 °C [14]. Таким образом, было обнаружено, что дофителид является сильнодействующим и селективным антиаритмиком III класса, который действует путём блокады сердечных калиевых каналов.

Дофетилид был одобрен Food and Drug Administration (FDA) в 1999 г. для купирования фибрилляции предсердий (ФП) и трепетания предсердий (ТП) и поддержания синусового ритма у симптоматических пациентов с ФП и ТП продолжительностью более 1 недели. Он с успехом применялся не по прямому назначению у пациентов с пароксизмальной ФП и ТП, а также с предсердной тахикардией и желудочковой тахикардией (ЖТ). Дофетилид имеет приемлемый профиль безопасности при назначении (или повторном приёме) под наблюдением в больнице и дозировке в соответствии с клиренсом креатинина. Наиболее серьёзным побочным эффектом терапии дофетилидом

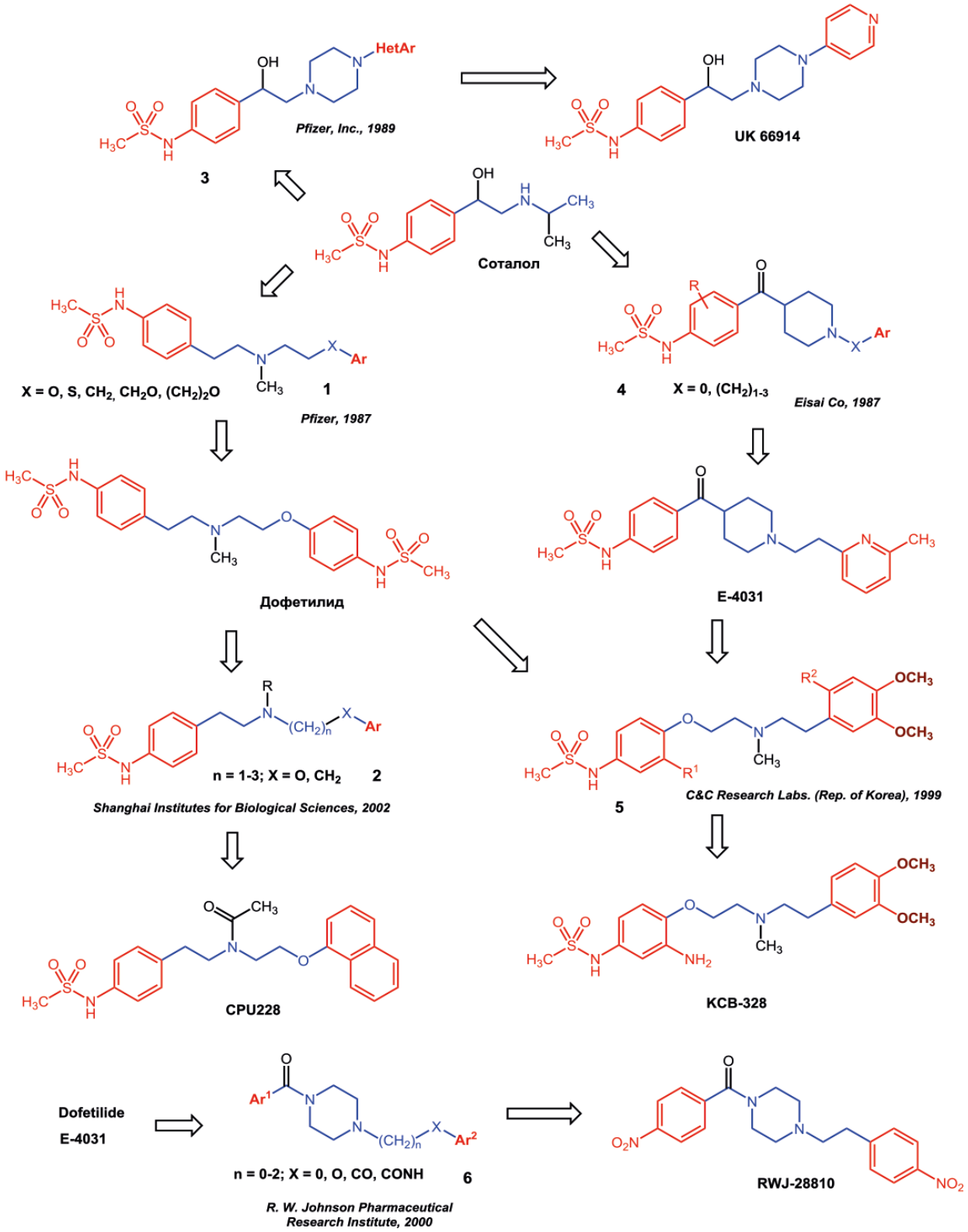


Рис. 1. Разработка биароматических hERG-блокаторов на основе структуры соталола
Fig. 1. Development of biaromatic hERG-blockers based on sotalol structure

является Torsade de Pointes (TdP). Дофетилид хорошо переносится и приемлем для пациентов с нормальной функцией почек и ненарушенным интервалом QT, особенно если необходимо избегать блокады атриовентрикулярного узла (АВУ). Этот препарат успешно используется и по сей день [15].

В 2002 г. *Liu H и соавт.* из Шанхайского института биологических наук (Китай) с использованием дофетилида в качестве прототипа антиаритмического средства III класса и 3D-QSAR моделей сконструировали и синтезировали его новые метилсульфонамидофенилэтиламиновые аналоги **2**. В этих соединениях *n*-метилсульфониламинофенилэтиловый фрагмент остался неизменным, а структуру второй ароматической группы и длину линкера варьировали.

Фармакологический анализ показал, что все соединения **2** проявляли активность в отношении увеличения ЭРП в изолированном предсердии животного. Показано, что процентное изменение задержки ЭРП при 10^{-5} М наиболее активным соединением **CPU228**, содержащим нафталин в качестве второй ароматической группы и ацетильную группу при атоме азота в линкере, значительно выше, чем у дофетилида; эффективная концентрация соединения CPU228 составляла $5{,}0\times10^{-8}$ М при увеличении ЭРП на 10 мс, что несколько ниже, чем у дофетилида [16]. CPU228 оказывает более сильное ингибирующее действие на коронарооккклюзию и реперфузионную аритмию и более низкую эффективность индукции TdP, чем дофетилид [17].

Было обнаружено, что CPU228 способен блокировать I_{CaL} (0,909 мМ; методика пэтч-кламп цельных клеток в желудочковых миоцитах морских свинок). При концентрации 3 мкМ CPU228 значительно подавлял токи Ca^{2+}. Авторы предположили, что CPU228 снижает TdP по сравнению с дофителидом благодаря наличию этого кальциевого компонента [18]. К сожалению, в литературе нет данных о дальнейшем развитии молекулы CPU228.

Другой группой производных соталола, разработанных в Pfizer, являются соединения **3**, содержащие пиперазиновый фрагмент в линкере, связанном с гетероароматической группой. Как и в соталоле, одним из заместителей в линкере была гидроксильная группа. Наиболее интересным соединением оказалось **UK 66914** с пиридиновым гетероциклом. Это соединение вызывало зависящее от концентрации увеличение ЭРП желудочков, при этом относительный порядок активности UK-66914 был намного выше, чем у d-соталола. Значения EC_{25} (эффективная концентрация, необходимая для увеличения ЭРП на 25 % по сравнению с исходным уровнем) составляли для UK-66914 0,501 мкМ; а для d-соталола 43,76 мкМ [19, 20].

Эффективность блокады тока I_K как механизма предотвращения аритмий, вызванных ишемией и реперфузией, была протестирована с использованием UK-66914 на кроликах. В концентрациях 0,3–1 мкМ UK-66914 снижал частоту реперфузионно-индуцированной фибрилляции желудочков (ФЖ) с 77 % в контроле до 38 и 31 %, соответственно. Частота аритмий, вызванных ишемией, была слишком низкой в контроле, чтобы можно было обнаружить антиаритмический эффект у кроликов; однако лекарственной проаритмии не наблюдалось [21].

Параллельно с созданием химической серии дофетилида и его аналогов компания Eisai Co. Ltd (Япония) вела работы по дизайну других биароматических производных соталола **4**, также содержащих п-метилсульфониламинофенил фармакофор. В отличие от соединений Pfizer, эта группа включала циклический пипиридиновый фрагмент и карбонильную группу в линкере. Соединения новой группы удлиняли продолжительность ПД в изолированном миокарде морских свинок и вызывали удлинение QTc-интервала ЭКГ у наркотизированных собак [22].

Для дальнейшей разработки было выбрано соединение **E-4031**, в котором вторая ароматическая группа представляет собой метилпиридин, а длина линкера составляет 8 связей. Было обнаружено, что это соединение является мощным агентом III класса, продлевающим ДПД при таких низких концентрациях, как 0,1 мкМ, и блокирующим I_K компонент в желудочковых миоцитах морской свинки (IC_{50} = 397 нМ) [23].

В экспериментах на наркотизированных собаках E-4031 обладал значительным положительным инотропным эффектом и потенциальными кардиопротекторными свойствами. E-4031 значительно и дозозависимо удлинял интервалы QT, интервалы QTc и желудочковую рефрактерность. Также E-4031 показал кардиозащитную активность на ряде других животных моделей [24].

В клинических исследованиях E-4031 вызывал удлинение интервала QT у больных с желудочковыми и наджелудочковыми аритмиями. Внутривенная инфузия E 4031 значительно удлиняла интервал QTc и предсердную и желудочковую ЭРП у пациентов с суправентрикулярными тахиаритмиями. E-4031 не оказывал существенного влияния на рефрактерность синоатриального или АВУ, время предсердной или желудочковой проводимости, артериальное давление (АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС). В тех же внутривенных дозах E-4031 значительно снижал частоту повторяющихся предсердных импульсов, вызванных программируемой электростимуляцией у 10 пациентов с пароксизмальной наджелудочковой тахиаритмией. В исследовании у пациентов с аритмиями эффекты препарата наблюдались у 64 % реципиентов E 4031. Несмотря на удовлетворительные результаты данного исследования, дальнейшего развития препарат не получил [25].

Kim DI и др. из C&C Research Laboratories (Южная Корея) описали группу соединений **5**, разработанных на основе дофителида и соединения E-4031 с целью создания новых препаратов III класса без обратной частотной зависимости или с положительной частот-

ной зависимостью. Для этого в молекулы был введён 3,4-диметоксифенетиламиновый фрагмент. Антиаритмические эффекты III класса оценивали по пролонгации ЭРП в изолированных папиллярных мышцах морской свинки. Соединение **KCB-328** с длиной линкера 7 связей и содержащее дополнительную аминогруппу в основном фенильном кольце показало наиболее выраженное удлинение ЭРП. KCB-328 увеличивал ДПД в зависимости от концентрации при трёх разных темпах стимуляции (0,3; 1 и 3 Гц) подобно дофетилиду. При каждой концентрации KCB-328 ΔДПД90 при трёх частотах стимуляции были почти одинаковыми. Напротив, дофетилид значительно снижал ΔДПД90 при 3 Гц по сравнению с таковыми при 0,3 Гц и 1 Гц. Эти результаты позволяют предположить, что KCB-328 является новым антиаритмическим средством класса III с небольшой обратной частотной зависимостью в терапевтической концентрации. Исследование KCB-328 на животных моделях с аритмией показало, что это соединение обладает мощным антиаритмическим действием с малой проаритмической активностью. Механизмы улучшенных профилей частотной зависимости в производных 3,4-диметоксифенетиламина не ясны. Возможно, это является результатом соответствующей кинетики взаимодействия с подтипами выходящего калиевого тока, быстрого компонента I_{Kr} и медленного компонента I_{Ks} [26].

Электрофизиологический профиль KCB-328 в модели ТП у собак, особенно отсутствие у него обратного эффекта, зависящего от применения, на рефрактерность предсердий, продемонстрировал его значительный антиаритмический потенциал при лечении предсердных аритмий [27].

Kanojia RM с соавт. из Научно-исследовательского фармацевтического института Р. В. Джонсона (США) на основе структур дофетилида и E-4031 сконструировали новую группу **6**. Линкер в этих соединениях включал пипиразиновое кольцо и карбонильную группу. Среди нескольких активных соединений, идентифицированных в серии, **RWJ 28810** с EC_{20} 3 нМ считается одним из наиболее сильнодействующих (*in vitro*) hERG-блокаторов, о которых сообщалось (увеличение ЭРП в папиллярных мышцах анестезированных самцов хорьков). В этом соединении паранитрогруппы присутствуют в обоих ароматических фармакофорах, а длина линкера, также как в структуре E-4031, составляет 8 связей [28].

Hong L и др. из Китайского фармацевтического университета в 1999 г. синтезировали ряд производных дофитилида **7**, замещённых у центрального атома азота в линкере (рис. 2). Новые соединения (бензиловые и ацетильные производные) проявляли антиаритмическую активность у крыс, подобную активности дофетилида, в модели аритмии, вызванной аконитином [29].

Наиболее активным соединением было **DC031050** с бензильным заместителем, которое ингибировало

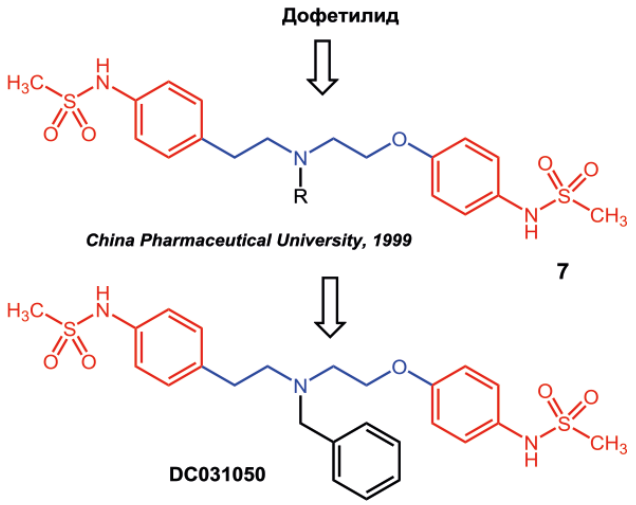


Рис. 2. Конструирование соединения DC031050
Fig. 2. Creation of DC031050

токи hERG со значением IC_{50} 2,3 нМ (17,9 нМ для дофителида). DC031050 ингибировал ток IK со значением IC_{50} 2,7 мкМ, что более чем в 1000 раз превышало концентрацию, необходимую для ингибирования тока hERG. DC031050 в концентрации 3 мкМ не оказывал значительного влияния на зависимость от напряжения устойчивой активации, устойчивой инактивации I_K или скорости инактивации I_K. Внутриклеточное применение DC031050 (5 мкМ) было недостаточным для ингибирования I_K. DC031050 в концентрациях до 10 мкМ не влиял на токи каналов KCNQ2 и Kv1.2 [30].

Амбасилид и его аналоги / Ambasilide and its analogues

Исследователи компании BASF Aktiengesellschaft (Германия) в первой половине 1980-х годов на основании предварительных данных об активности некоторых производных биспидина создали соединение **амбасилид**, проявившее мощное антиаритмическое действие на изолированные предсердия морской свинки (рис. 3) [31]. Амбасилид ингибировал каналы hERG с IC_{50} 3,6 мкМ [32]. Позднее было обнаружено, что амбасилид способен блокировать множественные сердечные каналы у различных животных и человека. Вероятно, это связано со значительными отклонениями в структуре молекулы по сравнению с другими блокаторами hERG. Помимо наличия в линкере биспидиновой системы, в одном ароматическом кольце присутствует аминогруппа, а другое кольцо не замещено.

Амбасилид удлинял интервалы RR, PQ, QRS, QT и QTc(F) в зависимости от концентрации либо при нормальном синусовом ритме, либо при сниженной ЧСС (атриэктомия) в изолированных сердцах морских свинок, подвергнутых перфузии. Амбасилид удлинял интервал QTc(F) в меньшей степени при

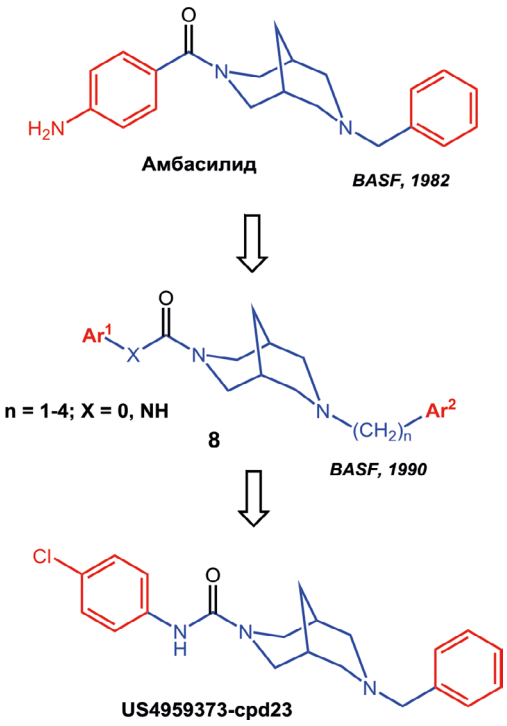


Рис. 3. Амбасилид и его производные
Fig. 3. Ambasilide and its derivatives

более медленном ЧСС. Также этот препарат подавлял тахикардию, вызванную изопротеренолом, что позволяет предположить, что он проявляет свойства блокирования β-адренорецепторов [33].

Позднее в этой же компании был запатентован ряд производных амбасилида **8**, отличающихся длиной линкера и строением ароматических фармакофоров. Соединения этого ряда были более эффективны в отношении удлинения интервала QT, чем амбасилид, а некоторые из них также превосходили по действию d-соталол.

Одно из наиболее активных соединений **US4959373-cpd23** с атомом хлора в фенильном кольце и с дополнительным азотом в линкере проявляло активность в «удлинении интервала QT с ED_{20} %» в дозе 2,4 мг/кг, в то время как амбасилид в дозе 6,3 мг/кг, а соталол – в дозе 3,6 мг/кг [34].

Нифекалант / Nifekalant

В 1992 г. *Katakami T и соавт.* из Mitsui Toatsu Chemicals Inc. (Япония) сконструировали группу соединений **9** в качестве антиаритмиков III класса на основе структуры β-блокатора **MS-3579** (рис. 4). В соединении MS-3579 был модифицирован 1,2-дигидроксиз-пропанаминовый фрагмент, характерный для β-блокаторов, а в ароматических циклах были использованы заместители, характерные для антиаритмических средств III класса: нитрогруппа, галогены или метилсульфониламидная группа. В качестве второго ароматического фармакофора использовали фрагмент пиримидиндиона. Среди полученных соединений подтверждена активность, характерная для антиаритмических средств III класса, выражающаяся в пролонгированном ПД при 75 % реполяризации изолированных волокон Пуркинье собак, без какой-либо β-блокирующей активности [35].

Нифекалант был одним из самых эффективных соединений этой серии с pKi (hERG) = 5,0; впоследствии он успешно прошёл клинические испытания. В этом соединении в основном ароматическом фармакофоре присутствует нитрогруппа, линейный линкер длиной 8 связей содержит два атома азота, а центральный атом азота имеет дополнительную гидроксиэтильную группу.

Было обнаружено, что нифекалант отличается от большинства метилсульфонамидных препаратов класса III, таких как соталол, E-4031 и дофетилид, блокированием транзиторного внешнего калиевого тока (I_{to}), внутреннего выпрямляющего калиевого тока (I_{K1}) и АТФ-чувствительного калиевого тока (I_{KATP}) в дополнение к калиевому току замедленного выпрямления (I_K). Учитывая такие электрофизиологические свойства, нифекалант уменьшал индуцированную реперфузией ФЖ у собак и крыс, подавлял программируемую электрическую стимуляцию желудочковых аритмий у собак с инфарктом миокарда и был эффективен в лечении тахиаритмий у людей [36]. *Furutani K* и др. обнаружили, что, в отличие от дофетилида, нифекалант индуцирует облегчение и увеличивает резерв реполяризации сердечных миоцитов, снижая вероятность запуска летальных желудочковых аритмий. Таким образом, этот препарат имеет значительно лучший профиль безопасности по сравнению с рядом других блокаторов hERG [37].

Терикалант / Tericalant

В 1990 г. *Hardy JC и соавт.* из Rhone-Poulenc Sante (Франция) запатентовали группу производных бензопирана **10**, созданных на основе 4-аминометилбензопиранов, обладающих гипотензивным и миорелаксантным действием (рис. 5). Новые соединения показали хорошие антиаритмические и антифибрилляционные свойства, характерные для антиаритмиков III класса по Vaughan William, что выражалось в удлинении рефрактерных периодов. В папиллярной мышце морской свинки *in vitro* соединения новой группы вызывали удлинение ПД на величины от 5 до более 50 % [38].

Терикалант с незамещённым бензопирановым кольцом и с 3,4-диметоксифенильной группой в качестве второго ароматического фрагмента из этой группы получил дальнейшее развитие. Это соединение дозозависимо удлиняло длительность ПД предсердий и желудочков в нормальной сердечной ткани, не влияя на V_{max}. Патч-кламп-исследования показали, что эти эффекты были опосредованы специфической блока-

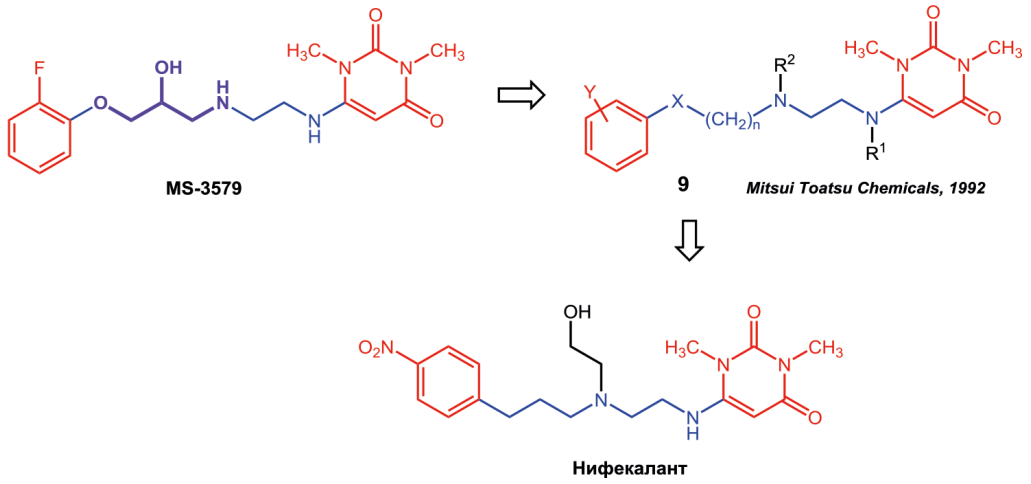


Рис. 4. Дизайн препарата нифекалант
Fig. 4. Design of nifekalant

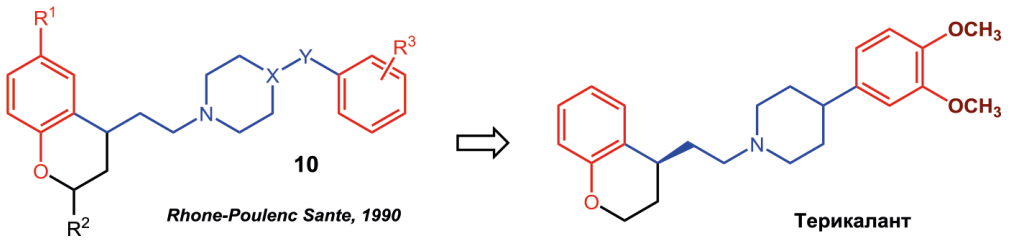


Рис. 5. Терикалант и его группа
Fig. 5. Terikalant and its group

дой внутреннего выпрямляющего K^+-тока. Активность терикаланта по блокированию калиевых каналов hERG очень высока (pIC_{50} = 7,51) [39]. В дополнение к основному блокирующему действию hERG в литературе также содержится информация о способности терикаланта блокировать быстрые натриевые каналы. Это наблюдение хорошо согласуется со структурой фармакофора этого препарата [40].

У анестезированных собак терикалант в зависимости от дозы удлинял предсердный, узловой и желудочковый рефрактерные периоды, не влияя на интервалы AH, AV или QRS. Введение терикаланта приводило к увеличению интервалов QT и QTc и снижению ЧСС. Терикалант показал некоторые антитахикардические свойства в модели ЖТ *in vitro*. В этой модели терикалант устранял ЖТ в 50 % случаев и был более эффективен в отношении аритмий с более короткой продолжительностью цикла или рефрактерными периодами. Терикалант вызывал удлинение продолжительности цикла и рефрактерного периода, а также уменьшение возбудимого промежутка независимо от того, была ли отменена ЖТ или нет. Предварительное лечение терикалантом снижало частоту фатальной ФЖ после перевязки коронарных артерий в модели на животных. Эти антифибрилляторные эффекты сопровождались отчётливым удлинением интервала QT и умеренной брадикардией. Некоторые антифибрилляторные эффекты также наблюдались у находящихся в сознании собак, подвергшихся предсердной стимуляции. Терикалант дозозависимо удлинял предсердный ЭРП независимо от ЧСС, но не влиял на синусовую ЧСС, время атриовентрикулярного проведения или скорость внутрипредсердного проведения. Терикалант снижал частоту ФП на 25 %. Однако терикалант также сокращал продолжительность ФП, и эти эффекты зависели от дозы [41].

Терикалант проходил доклинические испытания с Rhône-Poulenc Rorer (США) в качестве чистого антиаритмического средства класса III, но разработка, по-видимому, была прекращена.

Гибриды соталола и эрсентилида / Sotalol and Ersentilide hybrids

Connors SP и др. из Оксфордского университета (Великобритания) в 1991 г. разрабатывали потенциальные антиаритмические средства III класса **11** и **12** на основе структур **соталола** и антиаритмического средства II и III класса **эрсентилида** со смешанными функциями. Эти соединения содержат биароматическую структуру; линкер содержит 1,2-дигидрокси-3-пропанаминовый фрагмент, характерный для β-блокаторов (рис. 6). Одна из ароматических групп

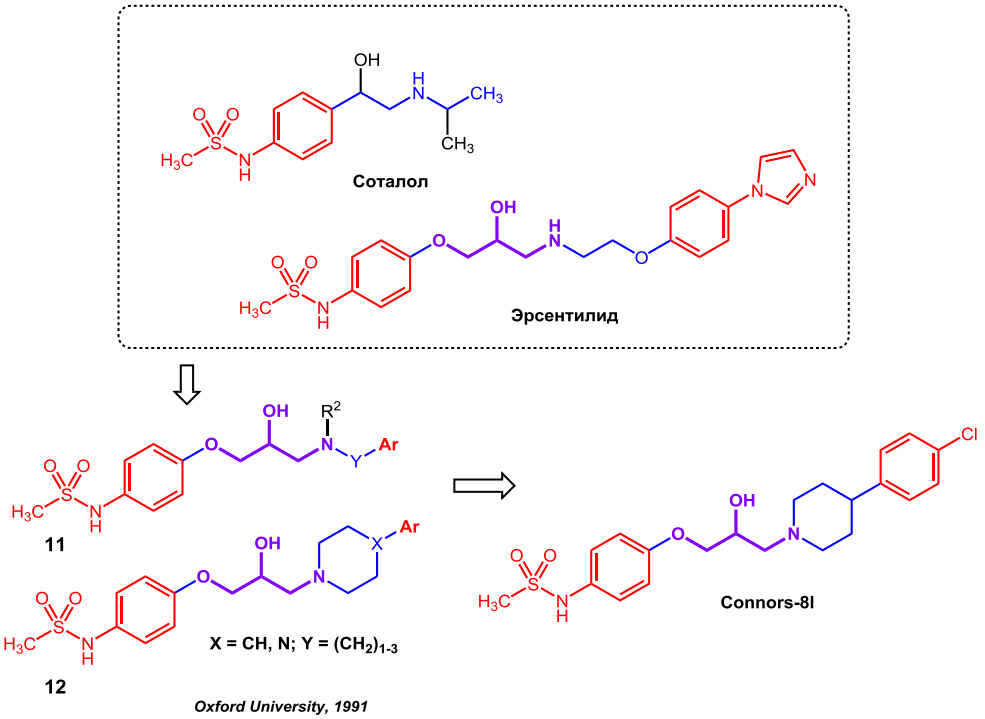


Рис. 6. Дизайн блокаторов hERG на основе структур соталола и эрсентилида
Fig. 6. Design of hERG-blockers based on sotalol and ersentilide structures

содержала метилсульфониламидный заместитель, характерный для блокаторов hERG.

Соединения тестировали на изолированных сердечных миоцитах морской свинки, на изолированных препаратах из предсердий морской свинки, также оценивали его влияние на АД крыс. Вторичные амины в ряду (R2 = H) проявляли остаточную β-блокирующую активность, тогда как включение в состав линкера N-алкилалициклических аминов отменяло β-блокирующую активность и приводило к увеличению hERG-блокирующей активности и удлинению сердечного ПД. Добавление гидрофобных групп Cl и CF3 дополнительно усиливало активность блокирования калиевых каналов. Соединение **Connors-8l** с атомом хлора в фенильном кольце и с пипиридиновым фрагментом в линкере вызывало значительное увеличение ДПД в наномолярных концентрациях, не влияя на скорость проводимости сердечной мышцы [42].

L 691121

В 1992 г. *Elliott JM и соавт.* из Merck Research Laboratories (США) создали группу производных 4-оксоспиро[бензопиран-2,4'-пиперидина] **13** на основании структурной информации об антиаритмических средствах III класса, содержащих метилсульфониламидную группу (соталол, сематилид, E- 4031, ибутилид, дофетилид и др.) (рис. 7). В изолированных папиллярных мышцах хорька эти соединения значительно продлевают ЭРП и вызывают умеренный положительный инотропный эффект [43]. Наиболее активным соединением оказалось **L 691121** с бензооксодиазольным кольцом в качестве

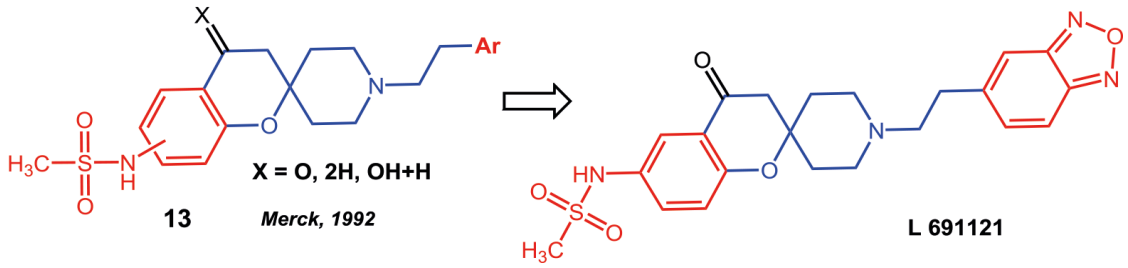


Рис. 7. L 691121 и его группа
Fig. 7. L 691121 and its group

второго ароматического кольца. Он удлинял ЭРП с EC_{25} = 13 нМ. В изолированных желудочковых миоцитах морской свинки L 691121 пролонгировал ПД путём селективной блокады (IC_{50} = 4,4 нМ) быстро активирующего и выпрямляющего компонента K^+-тока замедленного выпрямления, I_{Kr}. Активность L 691121 в изолированных папиллярных мышцах обратно зависела от частоты и реверсировалась при гипоксической перфузии. L 691121 умеренно подавлял частоту спонтанных сокращений (14 %) у морских свинок в изолированном правом предсердии при концентрациях до 3 мкМ. У собак под наркозом внутривенное введение L 691121 значительно повышало предсердную и желудочковую рефрактерность и удлиняло электрокардиографический интервал QT, но не изменяло проводимость в АВУ, волокнах Гиса–Пуркинье, предсердиях или желудочках. У собак под анестезией, длительно исследованных после инфаркта, L 691121 подавлял индукцию желудочковой тахиаритмии запрограммированной стимуляцией и снижал частоту летальных желудочковых аритмий, вызванных вторичной ишемией миокарда [44].

hERG в качестве анти-мишени / hERG as anti-target

Как упоминалось выше, каналы hERG являются терапевтической мишенью классических антиаритмических средств III класса по классификации Vaughan Williams. Вследствие блокады этих каналов удлиняется интервал QT сердечного цикла, что и наблюдается на электрокардиограмме. В то же время каналы hERG в настоящее время рассматриваются как важнейшая антимишень. Это связано с тем, что неантиаритмические препараты и их метаболиты также могут взаимодействовать с каналом hERG и вызывать удлинение интервала QT, повышая тем самым риск желудочковой аритмии и фибрилляции и иногда приводя к развитию TdP и внезапной смерти [45–48]. Такие препараты, как астемизол, цизаприд, сертиндол и терфенадин, были изъяты из продажи на большинстве рынков из-за этих нежелательных побочных эффектов со стороны сердца. В настоящее время тестирование безопасности hERG является обязательной проверкой в процессе разработки лекарств и требуется FDA (ICH guideline E14/S7B) [49].

В таблице 1 приведены примеры соединений различных фармакологических групп, соответствующих биароматическому фармакофору, с высоким сродством к каналам hERG и, как следствие, кардиальными побочными эффектами. Среди них антигистаминные препараты астемизол и терфенадин, прокинетик цизаприд, гастрокинетическое соединение домперидон, нейролептики пимозид, илоперидон и дроперидол, антидепрессант нефазодон.

В связи с наличием большого количества препаратов с отрицательным компонентом hERG было проведено множество исследований структурных модификаций известных блокаторов hERG с целью минимизации этого побочного эффекта. Эти работы имеют особую актуальность в случае разработки препаратов ряда БСЛ, поскольку именно среди этих соединений наблюдается подавляющее большинство блокаторов hERG. Серия работ по анализу структурных модификаций классических блокаторов hERG дофителида [58, 59] и E-4031 [60] были проведены исследователями из Лейденского университета (Нидерланды) с целью изучения влияния изменений практически всех фрагментов этих молекул на hERG-блокирующую активность (рис. 8).

Было обнаружено, что для снижения активности hERG дофетилидоподобных веществ следует избегать заместителей в ароматических кольцах. Если заместители необходимы для терапевтических мишеней, то следует избегать липофильных и электроноакцепторных групп. Предпочтение следует отдавать полярным и объёмным группам, таким как NH_2 и $NHCOCH_3$, чтобы увеличить стерические затруднения вокруг ароматического кольца (колец). Среди полярных групп карбонамиды предпочтительнее сульфонамидов для снижения сродства к каналам hERG. Чтобы уменьшить сродство соединения с протонированным азотом к каналу hERG, в первую очередь необходимо уменьшить pKa путём изменения заместителей в протонированном азоте. Также более предпочтительными являются вторичные, а не третичные амины. Стерические затруднения вблизи атома азота за счёт введения полярных и объёмных групп, таких как кислотное и/или фенильное кольцо, также могут снижать сродство к каналам hERG. По возможности следует отдавать предпочтение короткой и жесткой молекуле. Небольшое расстояние между одной из липофильных концевых групп и центральным атомом азота снижает сродство к каналам hERG [59].

В качестве ещё одной стратегии снижения hERG-активности дофетилида было предложено использовать положительно заряженный пиридиновый фрагмент вместо центрального третичного атома азота. В таких производных пиридина введение жёсткости и кислорода в линкер и его дополнительная жёсткость также снижали аффинность к hERG [58].

В случае структурных модификаций соединения E-4031 выявлены несколько иные закономерности снижения активности hERG. Было обнаружено, что, помимо изменения или удаления заместителей на периферийных ароматических кольцах, наиболее успешной стратегией снижения сродства к каналам hERG является введение амида в центр молекулы. Это практически устраняло hERG-аффинность. Карбонильная часть сама по себе неблагоприятна для связывания, а комбинация с соседним атомом азота является особенно полезным структурным мотивом для предотвращения блокады K^+ каналов hERG [60].

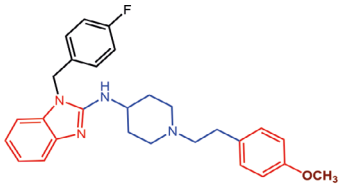
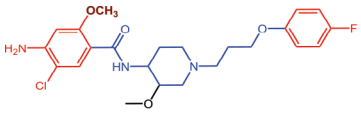
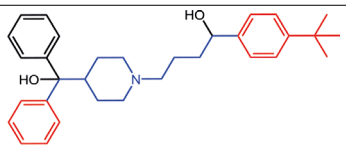
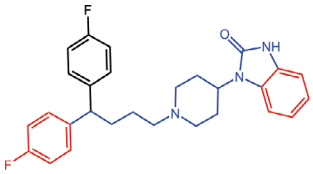
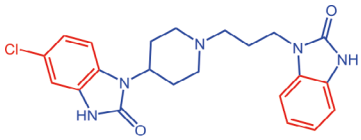
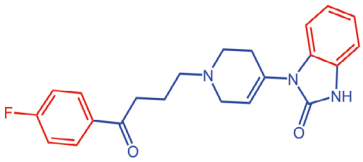
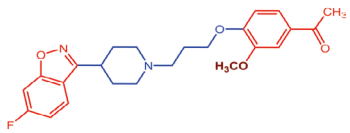
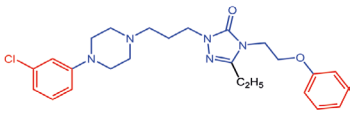
Здесь следует отметить, что хотя канал hERG является наиболее важным антимишенью, в последнее время считается, что анализ проаритмического действия соединений не может ограничиваться только этим каналом [61]. Это связано с наличием

Таблица 1

БСЛ различных фармакологических групп с hERG-компонентом

Table 1

BSL of various pharmacological groups with hERG-component

Соединение	Структура	Основная биомишень	hERG-активность
Астемизол		Астемизол – антигистаминный препарат второго поколения без седативного действия длительного действия, используемый для лечения симптомов аллергии. Астемизол действует как обратимый конкурентный ингибитор H1-рецепторов гистамина. Он был отозван с рынка производителем в 1999 году из-за способности вызывать аритмии при высоких дозах	Астемизол блокировал ток hERG IC_{50} 0,9 нМ (линия клеток млекопитающих (HEK 293), методика пэтч-кламп) [50]
Цизаприд		Цизаприд является прокинетиком. Цизаприд способствует высвобождению ацетилхолина из межжелудочковых сплетений, что приводит к усилению моторики желудочно-кишечного тракта. Кроме того, было обнаружено, что цизаприд действует как агонист серотонина, стимулируя рецепторы 5-HT4, и антагонист серотониновых рецепторов 5-HT3	В условиях фиксации напряжения блокада hERG цизапридом зависит от дозы с полумаксимальной ингибирующей концентрацией 6,5 нМ (клетки HEK293) [51]
Терфенадин		Терфенадин является пролекарством, которое метаболизируется кишечным CYP3A4 в активную форму фексофенадина, селективного антагониста гистаминовых H1-рецепторов с антигистаминным и неседативным действием	IC_{50} терфенадина для тока hERG составляло 30,6 нМ (клетки HEK293, экспрессирующие канал hERG-GFP) [52]
Пимозид		Пимозид является антипсихотическим средством, которое также используется для лечения лицевых тиков	Пимозид блокирует hERG канал с IC_{50} 18 нМ [53]
Домперидон		Домперидон является периферическим специфическим антагонистом дофаминовых рецепторов D2 (D2R), обладающим противорвотным, гастрокинетическим и галактагогическим действием	Домперидон блокирует каналы hERG транзиентно экспрессированные в клетках почек эмбриона человека (HEK 293) с IC50 57,0 нМ (цельноклеточный пэтч-кламп) [54]
Дроперидол		Дроперидол представляет собой бутирофенон с противорвотными, седативными и успокаивающими свойствами	Хвостовые токи hERG после тестовых импульсов до 50 мВ ингибировались дроперидолом с IC_{50} 77,3 нМ (клетки эмбриональной почки человека 293, методика цельноклеточного пэтч-кламп) [55]
Илоперидон		Илоперидон — атипичный антипсихотик для лечения шизофрении	Илоперидон удлиняет интервал QT, сердечный АД и является мощным блокатором hERG. Эксперименты пэтч-кламп показали IC50 для илоперидона 161 нМ для тока hERG [56]
Нефазодон		Нефазодон является атипичным антидепрессантом. Он является антагонистом серотонина и ингибитором обратного захвата из-за его комбинированного действия в качестве мощного антагониста серотониновых рецепторов 5-HT2A и 5-HT2C, а также слабого ингибитора обратного захвата серотонина, норадреналина и дофамина	Кардиотоксичность, индуцированная нефазодоном, обусловлена приобретённым удлинением интервала QT вследствие блокады канала hERG. Нефазодон снижал амплитуду пика IKr в зависимости от концентрации с относительно высоким сродством (IC_{50} 61,8 нМ) [57]

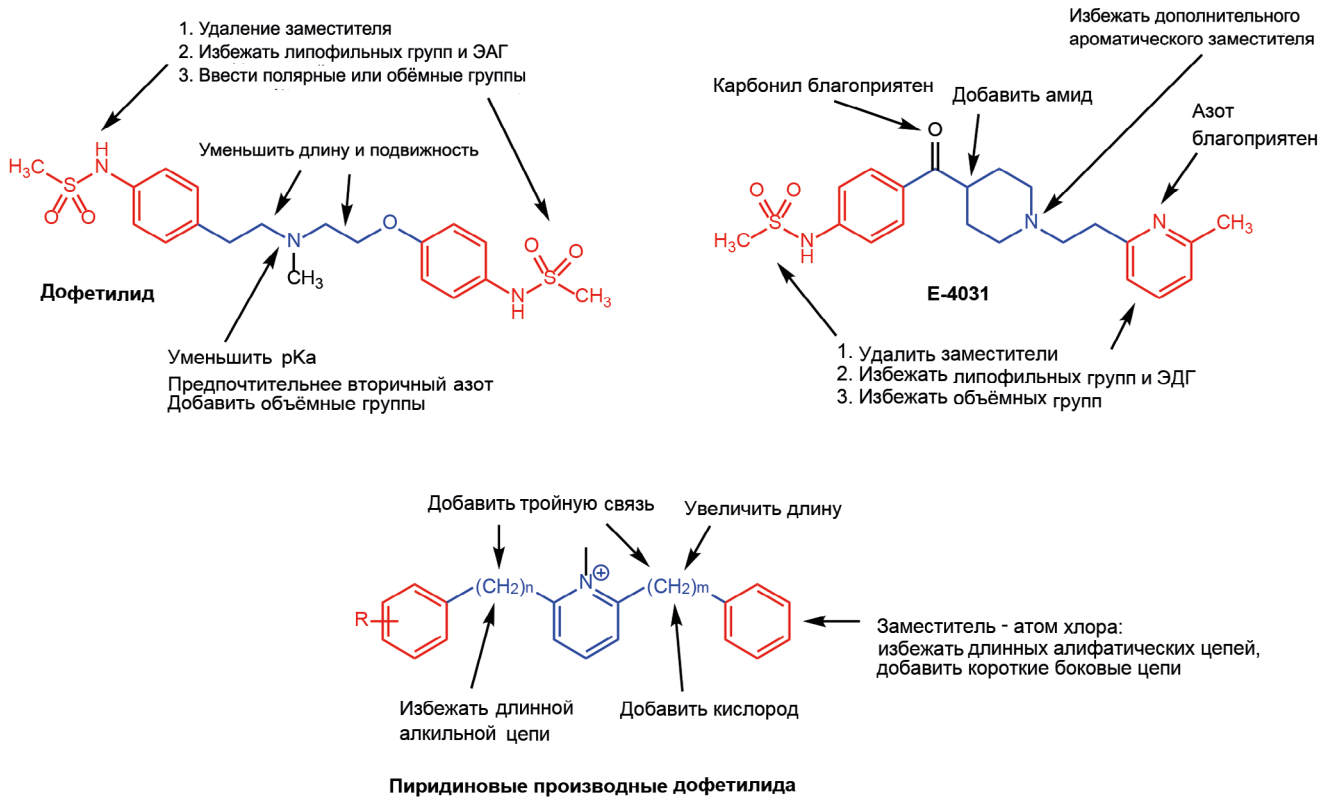


Рис. 8. Различные стратегии снижения hERG-активности дофетилида и E-4031
Fig. 8. Different strategies to reduce the hERG activity of dofetilide and E-4031

ряда соединений без проаритмического действия, которые помимо hERG-блокирующей активности также связываются с другими каналами (например, ранолазин), а также наличием препаратов с другими проаритмическими механизмами. Среди прочего, альфузозин является примером препарата с незначительной чувствительностью к hERG, хотя он вызывает удлинение интервала QT за счёт увеличения тока Na^+ [62]. *Kramer J* и др. оценили, может ли определение спектра аффинности соединения к определённому блоку нескольких ионных каналов более точно предсказать торсадогенный потенциал соединения, в сравнении с hERG-ингибирующей активностью [63]. Модели логистической регрессии с использованием данных, полученных с помощью методов высокопроизводительного скрининга электрофизиологии множественных ионных каналов (MICE), показали значительное снижение ложноположительных результатов (ошибки 1-го типа) и ложноотрицательных результатов (ошибки 2-го типа) по сравнению с анализом hERG для 32 препаратов различных классов с TdP и для 23 препаратов без TdP. Очевидно, что при наличии огромного количества ионных токов, поддерживающих функцию желудочковых миоцитов, суммарный физиологический эффект препарата с мультитаргетным механизмом должен состоять из противоположных или синергических эффектов на эти токи.

В настоящее время в рамках инициативы «Комплексный анализ проаритмии *in vitro*» (CiPA) разработан комплексный подход с использованием различных моделей *in vitro* и *in silico* для прогнозирования риска проаритмии [64, 65]. Основные компоненты CiPA включают *in vitro* анализы с использованием ионных каналов человека, в ходе которых проводится оценка эффектов кандидата в лекарство на ключевые деполяризующие и реполяризующие ионные токи, участвующие в формировании желудочкового ПД человека. Затем проводится анализ ПД *in silico*, который позволяет на основании результатов *in vitro* экспериментов предсказать наличие TdP-эффекта у исследуемого соединения.

Наконец, осуществляется *in vitro* анализ электрофизиологических эффектов кандидата в лекарство в желудочковых кардиомиоцитах стволовых клеток человека [64].

Заключение по блокаторам hERG / Conclusion on hERG-blockers

Данные литературы свидетельствуют о том, что большое количество БСЛ относится к классу блокаторов hERG, в том числе и клинически эффективный препарат дофителид. Обобщение структурных данных для этого подкласса соединений позволяет выявить следующую модель фармакофора (рис. 9). Одна из аро-

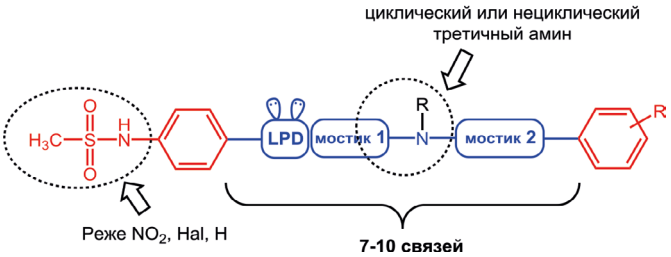


Рис. 9. Модель hERG-блокаторов
Fig. 9. hERG-blockers model

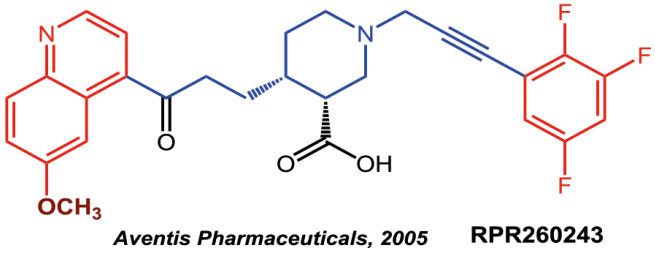


Рис. 10. Структура RPR260243
Fig. 10. Structure of RPR260243

матических групп в этой модели чаще всего содержит метилсульфонильную группу, реже нитрогруппу или атом галогена. Это ароматическое ядро чаще всего связано с гетероатомом или группой, содержащей гетероатом с двумя парами электронов. Эта группа связана через два мостиковых фрагмента со второй ароматической группой. Между мостиками всегда находится третичный атом азота, содержащий либо небольшой заместитель, либо один из циклических мостиков. Сами мостики чаще всего представляют собой линейные или циклические алифатические фрагменты. Общая длина линкера, соединяющего две ароматические группы, обычно составляет 7–10 связей. Вторая ароматическая группа может быть свободной и содержать более разнообразные заместители как электронодонорные, так и электроноакцепторные.

Активаторы/модуляторы hERG / hERG-Activators/modulators

Концепция дизайна кардиопротекторных агентов среди активаторов/модуляторов hERG разрабатывалась с 2005 года. Такие соединения, увеличивая ток калия наружу во время желудочкового ПД, могут уменьшать его продолжительность, что приводит к медикаментозно-индуцированному синдрому короткого интервала QT и связанным с этим проблемам безопасности. Однако понимание фармакологии активаторов hERG важно не только с точки зрения безопасности, поскольку их усиление тока hERG было предложено в качестве средства нормализации желудочковой ДПД у пациентов с врождёнными формами синдрома удлинённого интервала QT. Большинство созданных на сегодняшний день активаторов/модуляторов hERG имеют БСЛ-структуру.

В 2005 году *Kang J и соавт.* из Aventis Pharmaceuticals (США) открыли первый активатор hERG – соединение **RPR260243** (рис. 10). Метоксихинолиновые и трифторфенильные группы присутствуют в этой молекуле в виде ароматических фармакофоров. Линкер из 11 связей конформационно фиксирован тройной связью, карбонильной группой и пипиридиновым кольцом с дополнительной карбоксильной группой. С помощью пэтч-кламп метода было показано, что RPR260243 резко замедляет деактивацию тока при применении в клетках, стабильно экспрессирующих hERG. Эффекты RPR260243 на дезактивацию канала hERG зависели от температуры и напряжения и проявлялись в диапазоне концентраций от 1 до 30 мкМ. Токи hERG, модифицированные RPR260243, ингибировались дофетилидом (IC50 58 нМ). RPR260243 мало влиял на амплитуду тока hERG и не существенно влиял на стационарные параметры активации или процессы инактивации каналов. RPR260243 усиливал ток замедленного выпрямления в миоцитах морской свинки, но при отдельном введении мало влиял на параметры ПД в этих клетках. Однако это соединение полностью обращало вспять действие дофетилида, пролонгирующего ПД. RPR260243 увеличивал амплитуду зубца T, удлинял интервал PR и укорачивал интервал QT [66].

RPR260243 стал прототипом нового класса соединений, агонистов каналов hERG.

Zhou J и др. из Pfizer Global Research and Development (США) в том же 2005 г. представили группы из нескольких мощных активаторов hERG **14** и **15** из группы БСЛ с дополнительным фенильным кольцом в составе линкера (рис. 11). Одним из примеров является **PD-118057**, который вызывал среднее увеличение пикового хвостового тока hERG на 5,5, 44,8 и 111,1 % при 1, 3 и 10 мкМ, соответственно, в клетках почки эмбриона человека 293. PD 118057 не влиял на зависимость от напряжения и кинетику параметров стробирования, а также не требовал открытой конформации канала. В изолированных кардиомиоцитах морской свинки PD-118057 не оказывал существенного влияния на I_{Na}, I_{CaL}, I_{K1} и I_{Ks}. Это соединение укорачивало ДПД и интервал QT в тканях желудочка кролика с артериальной перфузией в зависимости от концентрации. Присутствие 3 мкМ PD-118057 сокращало ДПД и удлинение интервала QT, вызванное дофетилидом. «Ранние постдеполяризации», индуцированные дофетилидом, также полностью устранялись 3 мкМ PD-118057.

Ароматические фармакофоры PD-118057 содержат атомы хлора и карбоксильную группу, а в линкере из 8 связей помимо фенильного кольца присутствует ещё и атом азота. Соединение PD-307243, близкое по

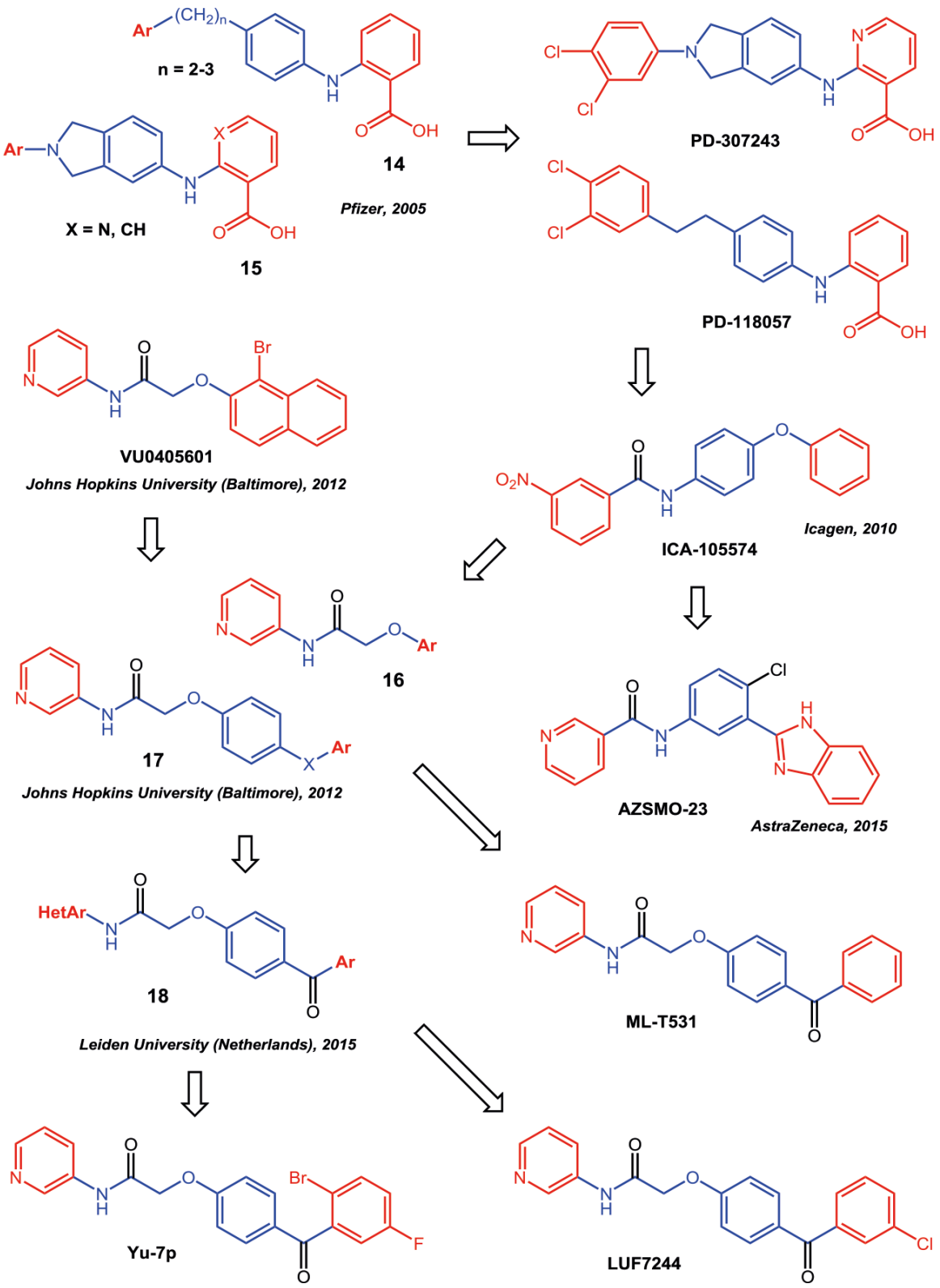


Рис. 11. Разработка модуляторов hERG среди БСЛ с центральным фенильным кольцом
Fig. 11. Development of hERG modulators among BSL with central phenyl ring

спектру активности PD-118057, имеет схожую структуру и отличается дополнительным пирролидиновым кольцом в линкере и заменой фенила на пиридин в ароматической части [67].

Позже (в 2010 г.) *Gerlach AC* и др. из Icagen, Inc. (США) описали соединение **ICA 105574** с аналогичной структурой фармакофора, которое, как было установлено, является эффективным активатором канала hERG с уникальным механизмом действия. Это соединение также имеет фенильное кольцо в центральной части линкера, которое связано через амидную группу с нитрофенильным заместителем и через атом кислорода со вторым фенильным кольцом.

В исследованиях рекомбинантных каналов hERG с пэтч-клампом на целых клетках ICA-105574 резко потенцировал амплитуды тока более чем в 10 раз при значении EC_{50} 0,5 мкМ. Влияние на каналы hERG было подтверждено, поскольку известные блокаторы каналов hERG, E-4031 и BeKm1, значимо блокировали стимулирующие эффекты ICA-105574. Первичный механизм, с помощью которого ICA-105574 потенцирует активность канала hERG, заключается в удалении инактивации канала hERG, поскольку ICA-105574 (2 мкМ) сдвигает среднюю точку зависимости инактивации от напряжения на 180 мВ с –86 до +96 мВ. Помимо влияния на инактивацию, более высокие концентрации ICA-105574 (3 мкМ) вызывали сравнительно небольшие гиперполяризующие сдвиги (до 11 мВ) в зависимости от напряжения активации каналов и 2-кратное замедление дезактивации каналов. В изолированных миоцитах желудочков сердца морской свинки ICA-105574 индуцировал зависящее от концентрации укорочение ДПД (70 %, 3 мкМ), которое можно было предотвратить путём предварительной инкубации с E-4031 [68].

Было обнаружено, что ICA-105574 в зависимости от концентрации укорачивает ДПД в желудочковых миоцитах и интервалы QT/QTc в изолированных сердцах морских свинок. ICA-105574 полностью предотвращал желудочковые аритмии в интактных сердцах морских свинок, вызванные ингибиторами I_{Kr} и I_{Ks}. Это соединение может обратить вспять индуцированное лекарственным средством удлинение ПД в желудочковых миоцитах. Обратное удлинение интервалов QT/QTc и противодействие увеличению трансмуральной дисперсии реполяризации и нестабильности интервала QT, индуцированных ингибиторами I_{Kr} и I_{Ks}, способствовали антиаритмическому эффекту ICA-105574. Между тем, ICA-105574 в более высоких концентрациях показал потенциальный проаритмический риск в нормальных сердцах [69].

В 2012 году *Potet F с соавт.* из Университета Джона Хопкинса (США) с помощью высокопроизводительного анализа исследовали библиотеку соединений как агентов, повышающих IC_{50} дофетилида. Нафталин- и пиридинсодержащее соединение **VU0405601** с желаемой активностью было дополнительно охарактеризовано. В изолированных сердцах кроликов, перфузированных по Лангендорфу, оптическое картирование показало, что аритмии, вызванные дофетилидом, уменьшались после предварительной обработки VU0405601. Пэтч-кламп-анализ в стабильных клетках hERG-HEK показал влияние VU0405601 на амплитуду тока, инактивацию и дезактивацию. VU0405601 увеличивал IC_{50} дофетилида с 38,7 до 76,3 нМ. Также препарат смягчал эффекты блокаторов hERG с внеклеточным механизмом, главным образом, за счёт уменьшения инактивации, тогда как большинство клинически значимых ингибиторов hERG действуют во внутренних порах. Анализ связи структура–активность в ряду аналогов VU0405601 показал, что 3 пиридильная и нафтиридиновая кольцевые системы являются ключевыми структурными компонентами, важными для предотвращения ингибирования hERG [70].

AZSMO-23 был разработан на базе соединения ICA-105574 *Mannikko R с соавт.* из AstraZeneca (Великобритания) в 2015 г. как ещё один активатор канала hERG (Kv11.1). В этом соединении по сравнению с ICA-105574 нитрофенильная группа заменена на пиридиновую, а оксифенильная на бензимидазольную. Атом хлора также присоединён к центральному фенильному кольцу. AZSMO-23 активировал предимпульсный и хвостовой ток hERG со значениями EC_{50} 28,6 и 11,2 мкМ, соответственно. При 100 мкМ ток перед импульсом при +40 мВ увеличился на 952 %, а хвостовой ток при –30 мВ на 238 % по сравнению со значениями для контроля. Основным механизмом этого эффекта был деполяризующий сдвиг на 74,5 мВ в зависимости инактивации от напряжения без какого-либо сдвига зависимости активации от напряжения. Анализ связи структура–активность показал, что близкие аналоги AZSMO-23 (4-пиридильные или фенильные производные) действуют как ингибиторы hERG. AZSMO-23 блокировал мутантный канал, hERG Y652A, но в отношении другого мутантного канала, hERG F656T, его активаторная активность была усилена. Он ингибировал активность G628C/S631C неинактивирующего мутантного канала hERG. AZSMO-23 не был селективен к hERG, поскольку он блокировал человеческий Kv4.3-KChIP2.2, Cav3.2 и Kv1.5 и активировал каналы Cav1.2/β2/α2δ [71].

На основе информации о структуре соединений ICA-105574 и VU0405601 исследователи из Университета Джона Хопкинса (Балтимор) в 2012 г. сконструировали пиридинсодержащие биароматические соединения **16** и **17** с дополнительным бензольным циклом в линкере или без него. Используя автоматизированную систему, авторы провели большой скрининг библиотеки соединений для идентификации и характеристики низкомолекулярных модуляторов калиевых каналов hERG. **ML-T531** с амидными и карбонильными группами в линкере был одним из мощных активаторов с наивысшей эффективностью (EC_{50} = 3,13 мкМ) и был

выбран для дальнейшего исследования. ML-T531 при тестировании в концентрации 10 мкМ значительно потенцирует стационарные и хвостовые токи hERG в клетках CHO. Он имеет почти одинаковую активность, измеренную по укорочению ПД в кардиомиоцитах и по устойчивому увеличению тока в гетерологически экспрессируемых каналах hERG. Кроме того, ML-T531 не оказывает заметного влияния на другие сердечные каналы, включая Cav1.2, Kir2.1, Nav1.5 и Kv4.3. Эти каналы являются молекулярными детерминантами I_{Ca}, I_{K1}, I_{Na} и I_{to} [72].

Исследователи из Лейденского университета (Нидерланды) в 2015 году продолжили исследования Университета Джонса Хопкинса, создав группу соединений **18**, отличающихся строением ароматических групп. Большинство соединений были отрицательными аллостерическими модуляторами связывания [^{3}H]-дофетилида с каналом. Соединение **Yu-7p** с бромфторфенильной группой было наиболее мощным негативным аллостерическим модулятором среди всех лигандов, значительно увеличивая скорость диссоциации дофетилида в анализе кинетического связывания радиолиганда, в то же время значительно снижая сродство дофетилида и астемизола в анализе конкурентного замещения [73].

Через год той же исследовательской группой было получено соединение **LUF7244** с атомом хлора в фенильной группе. С помощью анализа связывания [^{3}H]-дофетилида с мембранами экспрессирующих Kv11.1 клеток эмбриональной почки человека HEK-293 LUF7244 было обнаружено, что оно является отрицательными аллостерическими модулятором связывания дофетилида с каналом Kv11.1 с наиболее выраженным эффектом при 10 мкМ. Сродство к Kv11.1 типичных блокаторов (то есть дофетилида, астемизола, сертиндола и цизаприда) значительно снижалось под действием LUF7244. Лечение монослоев конфлюэнтных желудочковых миоцитов новорождённых крыс (NRVM) астемизолом или сертиндолом вызывало гетерогенную пролонгацию ПД и высокую частоту ранней постдеполяризации при электрической точечной стимуляции частотой 1 Гц, что иногда приводило к нестабильным, самокупирующимся тахиаритмиям. Предварительная обработка NRVM LUF7244 предотвращала эти проаритмические эффекты. Монослои NRVM, обработанные только LUF7244, демонстрировали электрофизиологические свойства, неотличимые от свойств необработанных культур NRVM. Продолжительное воздействие на NRVM LUF7244 или LUF7244 плюс астемизол не влияло на их жизнеспособность, возбудимость и сократимость по данным молекулярных, иммунологических и электрофизиологических анализов. Таким образом, аллостерическая модуляция канала Kv11.1 с помощью LUF7244 эффективно подавляет индуцированные лекарствами желудочковые аритмии *in vitro*, предотвращая потенциально аритмогенные изменения характеристик АД, повышая возможность возобновления клинического использования непреднамеренных блокаторов Kv11.1 посредством фармакологической комбинированной терапии [74].

Заключение по hERG-модуляторам / Conclusion on h-ERG-modulators

Структура обобщенной фармакофорной модели hERG-модуляторов серии БСЛ имеет ряд существенных отличий от hERG-блокаторов (рис. 12).

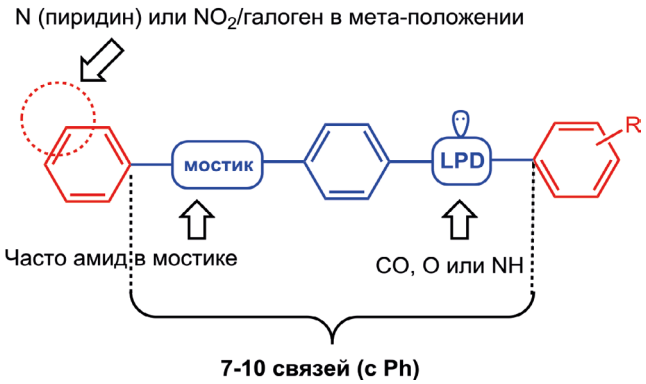


Рис. 12. Модель структур hERG-модуляторов
Fig. 12. hERG-modulators model

Во-первых, линкер содержит фенильное кольцо. Он связан с одним из ароматических заместителей мостиком, чаще всего содержащим амидную группу, а со вторым ароматическим заместителем — через гетероатом или группу с неподелённой электронной парой (азот, кислород, карбонил). Мета-положение первого ароматического заместителя часто содержит либо атом азота (пиридиновый гетероцикл), либо нитрогруппу, либо атом галогена. Суммарное расстояние между ароматическими фармакофорами с учётом промежуточной фенильной группы составляет 7 связей, как и в случае hERG блокаторов.

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, Российская Федерация

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. Chemical Sci., Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Ravens U, Odening KE. Atrial fibrillation: Therapeutic potential of atrial K^+ channel blockers. *Pharmacol Ther*. 2017;176:13–21. DOI: 10.1016/J.PHARMTHERA.2016.10.003

2. Ravens U. Atrial-selective K^+ channel blockers: potential antiarrhythmic drugs in atrial fibrillation? *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(11):1313–1318. DOI:10.1139/CJPP-2017-0024.

3. Jeevaratnam K, Chadda KR, Huang CLH, Camm AJ. Cardiac Potassium Channels: Physiological Insights for Targeted Therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2018;23(2):119–129. DOI: 10.1177/1074248417729880.

4. Nair LA, Grant AO. Emerging class III antiarrhythmic gents: mechanism of action and proarrhythmic potential. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1997;11(2):149–167. DOI: 10.1023/A:1007784814823.

5. Wulff H, Castle NA, Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(12):982–1001. DOi: 10.1038/nrd2983.

6. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с бароматической 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.

7. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с бароматической структурой. Часть 2. Блокаторы HCN-каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(2):3–10. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 2. HCN channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(2):3–10. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2022-2-3-10.

8. Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с бароматической структурой. Часть 3. Блокаторы натриевых каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(3):3–9. [Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 3. Sodium channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(3):3–9. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2022-3-3-9.

9. Vandenberg JI, Perry MD, Perrin MJ, Mann SA, Ke Y, Hill AP. hERG $K(^+)$ channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev*. 2012;92(3):1393–1478. DOI: 10.1152/PHYSREV.00036.2011.

10. Butler A, Helliwell MV, Zhang Y, Hancox JC, Dempsey CE. An Update on the Structure of hERG. *Front Pharmacol*. 2020;10:1572. DOI: 10.3389/FPHAR.2019.01572.

11. 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.

12. Arrowsmith JE, Cross PE, Thomas GN. GB Patent 8610668. Published online 1987. Accessed October 12, 2021. https://patentimages.storage.googleapis.com/74/ac/e3/672f569217d69e/EP0245997A2.pdf

13. Cross PE, Arrowsmith JE, Thomas GN, Gwilt M, Burges RA, Higgins AJ. Selective class III antiarrhythmic agents. 1. Bis(arylalkyl)amines. *J Med Chem*. 1990;33(4):1151–1155. DOI: 10.1021/JM00166A011.

14. Orvos P, Kohajda Z, Szlovák J, et al. Evaluation of Possible Proarrhythmic Potency: Comparison of the Effect of Dofetilide, Cisapride, Sotalol, Terfenadine, and Verapamil on hERG and Native IKr Currents and on Cardiac Action Potential. *Toxicol Sci*. 2019;168(2):365–380. DOI: 10.1093/TOXSCI/KFY299.

15. Wolbrette DL, Hussain S, Maraj I, Naccarelli G V. A Quarter of a Century Later: What is Dofetilide's Clinical Role Today? *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2018;24(1):3–10. DOI: 10.1177/1074248418784288.

16. Liu H, Ji M, Luo X, et al. New p-Methylsulfonamido Phenylethylamine Analogues as Class III Antiarrhythmic Agents: Design, Synthesis, Biological Assay, and 3D-QSAR Analysis. *J Med Chem*. 2002;45(14):2953–2969. DOI: 10.1021/JM010574U.

17. Wang T, Huang ZJ, Dai DZ, Ji M. Comparison of effects of dofetilide derivative V03(CPU228) and dofetilide on coronary occlusion and reperfusion arrhythmia, vascular contractions and proarrhythmic potential of torsade de pointes. *Chinese Pharmacol Bull*. 2004;20(5):516–520. Accessed October 12, 2021. https://www.researchgate.net/publication/289842760_Comparison_of_effects_of_dofetilide_derivative_V03CPU228_and_dofetilide_on_coronary_occlusion_and_reperfusion_arrhythmia_vascular_contractions_and_proarrhythmic_potential_of_torsade_de_pointes

18. Huang ZJ, Dai DZ, Li N, Na T, Ji M, Dai Y. Calcium antagonist property of CPU228, a dofetilide derivative, contributes to its low incidence of torsades de pointes in rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(4):310–317. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04555.x.

19. Baskin E, Serik C, Wallace A, et al. Effects of new and potent methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agents on myocardial refractoriness and contractility in isolated cardiac muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991;18(3):406–414. DOI: 10.1097/00005344-199109000-00014.

20. Cross PE, Dickinson RP. US Patent 4806536. Published online 1989.

21. Rees SA, Curtis MJ. Selective IK blockade as an antiarrhythmic mechanism: effects of UK66,914 on ischaemia and reperfusion arrhythmias in rat and rabbit hearts. *Br J Pharmacol*. 1993;108(1):139–145. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1993.TB13453.x.

22. Oinuma H. JP Patent 3927086. Published online 1987.

23. Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol*. 1990;96(1):195–215. DOI: 10.1085/jgp.96.1.195.

24. Adis R&D Profile. E 4031. *Drugs R D*. 1999;1(4):312–316. DOI: 10.2165/00126839-199901040-00006.

25. Okada Y, Ogawa S, Sadanaga T, Mitamura H. Assessment of reverse use-dependent blocking actions of class III antiarrhythmic drugs by 24-hour holter electrocardiography. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(1):84–89. DOI: 10.1016/0735-1097(95)00424-6.

26. Kim DI, Kim HY, Kwon LS, et al. Synthesis and biological activity of KCB-328 and its analogues: Novel class III antiarrhythmic agents with little reverse frequency dependence. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999;9(1):85–90. DOI: 10.1016/S0960-894X(98)00689-1.

27. Rahme MM, Ungab G, Wadhwa M, et al. Electrophysiologic and antiarrhythmic effects of the new class III antiarrhythmic Drug KCB-328 in experimental canine atrial flutter. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2001;6(3):297–306. DOI:10.1177/10742484010060031O.

28. Kanojia RM, Salata JJ, Kauffman J. Synthesis and class III type antiarrhythmic activity of 4-aroyl (and aryl)-1-aralkylpiperazines. *Bioorg Med Chem Lett*. 2000;10(24):2819–2823. DOI: 10.1016/S0960-894X(00)00581-3.

29. Hong L, Min J, Ligang L, Song J, Weiyi H, Ruimei L. Synthesis and Antiarrhythmic Activity of Some Methyl sulfonamido phenylethylamino Derivatives. *J China Pharmacevtical Univ*. 1999;30(1):7–12. Accessed October 12, 2021. http://www.zgykdxxb.cn/jcpuen/article/issue/1999_1

30. Li P, Sun H feng, Zhou P zheng, et al. Comparison of the effects of DC031050, a class III antiarrhythmic agent, on hERG channel and three neuronal potassium channels. Acta Pharmacol Sin. 2012;33(6):728–736. DOI: 10.1038/aps.2012.41.

31. Binnig F, Mueller CD, Raschack M, von Philipsborn G. US Patent 4556662. Published online 1985.

32. Walker BD, Singleton CB, Tie H, et al. Comparative effects of azimilide and ambasilide on the human ether-a-go-go-related gene (HERG) potassium

channel. *Cardiovasc Res*. 2000;48(1):44–58. DOI: 10.1016/S0008-6363(00)00155-3.

33. Kijtawornrat A, Hamlin RL, Hamlin DM. Effects of ambasilide in isolated perfused guinea pig heart. *Cardiovasc Toxicol*. 2005;5(1):53–62. DOI: 10.1385/CT:5:1:053.

34. Lubisch W, Binnig F, Philipsborn G von. US Patent 4959373. Published online 1990.

35. Katakami T, Yokoyama T, Miyamoto M, et al. Synthesis and pharmacological studies of N-substituted 6-[(2-aminoethyl)amino]-1,3-dimethyl-2,4(1H,3H)-pyrimidinediones, novel class III antiarrhythmic agents. *J Med Chem*. 1992;35(18):3325–3330. DOI: 10.1021/JM00096A003.

36. Satoh Y, Sugiyama A, Takahara A, Chiba K, Hashimoto K. Electropharmacological and proarrhythmic effects of a class III antiarrhythmic drug nifekalant hydrochloride assessed using the *in vivo* canine models. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;43(5):715–723. DOI: 10.1097/00005344-200405000-00015.

37. Furutani K, Tsumoto K, Chen IS, et al. Facilitation of IKr current by some hERG channel blockers suppresses early afterdepolarizations. *J Gen Physiol*. 2019;151(2):214–230. DOI: 10.1085/JGP.201812192.

38. Hardy JC, Renault C. US Patent 4977166. Published online 1990.

39. Du L, Li M, You Q, Xia L. A novel structure-based virtual screening model for the hERG channel blockers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;355(4):889–894. DOI: 10.1016/J.BBRC.2007.02.068.

40. Biliczki P, Acsai K, Virág L, et al. Cellular electrophysiological effect of terikalant in the dog heart. *Eur J Pharmacol*. 2005;510(3):161–166. DOI: 10.1016/J.EJPHAR.2004.12.040.

41. Escande D, Mestre M, Cavero I, Brugada C, Kirchhof C. RP 58866 and its active enantiomer RP 62719 (terikalant): blockers of the inward rectifier K^+ current acting as pure class III antiarrhythmic agents. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20 Suppl 2:s106-13. Accessed October 12, 2021. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1279302/

42. Connors SP, Dennis PD, Gill EW, Terrar DA. The synthesis and potassium channel blocking activity of some (4-methanesulfonamidophenoxy) propanolamines as potential class III antiarrhythmic agents. *J Med Chem*. 2002;34(5):1570–1577. DOI: 10.1021/JM00109A007.

43. Elliott JM, Selnick HG, Claremon DA, et al. 4-Oxospiro[benzopyran-2,4'-piperidines] as class III antiarrhythmic agents. Pharmacological studies on 3,4-dihydro-1'-[2-(benzofurazan-5-yl)ethyl]-6-methanesulfonamidospiro[(2H)-1-benzopyran-2,4'-piperidin]-4-one (L-691,121). *J Med Chem*. 2002;35(21):3973–3976. DOI: 10.1021/JM00099A028.

44. Lynch JJ, Wallace AA, Van der Gaag LH, et al. Cardiac electrophysiologic and antiarrhythmic actions of 3,4-dihydro-1'-[2-(benzofurazan-5-yl) ethyl]-6-methanesulfonamidospiro [(2H)-1-benzopyran-2,4'-piperidin]-4-one HCl (L-691,121), a novel class III agent. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;265(2):720-30.

45. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. Nature. 2006;440(7083):463–469. DOI: 10.1038/nature04710.

46. Leishman DJ, Abernathy MM, Wang EB. Revisiting the hERG safety margin after 20 years of routine hERG screening. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2020;105:106900. DOI: 10.1016/J.VASCN.2020.106900.

47. Lee K, Park JY, Ryu PD, Kwon LS, Kim HY. IKr channel blockers: novel antiarrhythmic agents. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2003;1(3):203–223. DOI: 10.2174/1568016033477414.

48. Zolotoy AB, Plouvier BP, Beatch GB, Hayes ES, Wall RA, Walker MJA. Physicochemical determinants for drug induced blockade of HERG potassium channels: effect of charge and charge shielding. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents. 2003;1(3):225–241. DOI: 10.2174/1568016033477432.

49. Valentin JP, Hammond T. Safety and secondary pharmacology: Successes, threats, challenges and opportunities. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2008;58(2):77–87. DOI:10.1016/J.VASCN.2008.05.007.

50. Zhou Z, Vorperian VR, Gong Q, Zhang S, January CT. Block of HERG potassium channels by the antihistamine astemizole and its metabolites desmethylastemizole and norastemizole. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1999;10(6):836-843. DOI: 10.1111/J.1540-8167.1999.TB00264.X.

51. Mohammad S, Zhou Z, Gong Q, January CT. Blockage of the HERG human cardiac K^+ channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride. *Am J Physiol Circ Physiol*. 1997;42(5):2534–2538. DOI: 10.1152/AJPHEART.1997.273.5.H2534.

52. Tanaka H, Takahashi Y, Hamaguchi S, et al. Effect of terfenadine and pentamidine on the HERG channel and its intracellular trafficking: combined analysis with automated voltage clamp and confocal microscopy. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(11):1826–1830. DOI: 10.1248/bpb.b14-00417.

53. Kang J, Wang L, Cai F, Rampe D. High affinity blockade of the HERG cardiac $K(^+)$ channel by the neuroleptic pimozide. *Eur J Pharmacol*. 2000;392(3):137–140. DOI: 10.1016/S0014-2999(00)00123-0.

54. Claassen S, Zünkler BJ. Comparison of the effects of metoclopramide and domperidone on HERG channels. *Pharmacology*. 2005;74(1):31–36. DOI: 10.1159/000083234.

55. Luo T, Luo A, Liu M, Liu X. Inhibition of the HERG channel by droperidol depends on channel gating and involves the S6 residue F656. *Anesth Analg*. 2008;106(4):1161–1170. DOI: 10.1213/ANE.0B013E3181684974.

56. Vigneault P, Pilote S, Patoine D, Simard C, Drolet B. Iloperidone (Fanapt®), a novel atypical antipsychotic, is a potent HERG blocker and delays cardiac ventricular repolarization at clinically relevant concentration. *Pharmacol Res*. 2012;66(1):60–65. DOI: 10.1016/J.PHRS.2012.03.008.

57. Lee S, Lee HA, Choi SW, Kim SJ, Kim KS. Evaluation of nefazodone-induced cardiotoxicity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;296:42–53. DOI: 10.1016/J.TAAP.2016.01.015.

58. Carvalho JFS, Louvel J, Doornbos MLJ, et al. Strategies to reduce HERG K^+ channel blockade. Exploring heteroaromaticity and rigidity in novel pyridine analogues of dofetilide. *J Med Chem*. 2013;56(7):2828–2840. DOI: 10.1021/JM301564F.

59. Shagufta, Guo D, Klaasse E, et al. Exploring chemical substructures essential for HERG $k(^+)$ channel blockade by synthesis and biological evaluation of dofetilide analogues. *ChemMedChem*. 2009;4(10):1722–1732. DOI: 10.1002/CMDC.200900203.

60. Vilums M, Overman J, Klaasse E, Scheel O, Brussee J, IJzerman AP. Understanding of molecular substructures that contribute to hERG K^+ channel blockade: synthesis and biological evaluation of E-4031 Analogues. *ChemMedChem*. 2012;7(1):107–113. DOI: 10.1002/CMDC.201100366.

61. Polak S, Pugsley MK, Stockbridge N, Garnett C, Wiśniowska B. Early Drug Discovery Prediction of Proarrhythmia Potential and Its Covariates. *AAPS J*. 2015;17(4):1025–1032. DOI: 10.1208/S12248-015-9773-1.

62. Lacerda AE, Kuryshev YA, Chen Y, et al. Alfuzosin delays cardiac repolarization by a novel mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324(2):427–433. DOI: 10.1124/JPET.107.128405.

63. Kramer J, Obejero-Paz CA, Myatt G, et al. MICE models: superior to the HERG model in predicting Torsade de Pointes. *Sci Rep*. 2013;3(1):2100. DOI: 10.1038/SREP02100.

64. Cavero I, Guillon JM, Ballet V, Clements M, Gerbeau JF, Holzgrefe H. Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay (CiPA): Pending issues for successful validation and implementation. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016;81:21–36. DOI: 10.1016/J.VASCN.2016.05.012.

65. Li Z, Garnett C, Strauss DG. Quantitative Systems Pharmacology Models for a New International Cardiac Safety Regulatory Paradigm: An Overview of the Comprehensive *In Vitro* Proarrhythmia Assay *In Silico* Modeling Approach. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2019;8(6):371–379. DOI: 10.1002/PSP4.12423.

66. Kang J, Chen XL, Wang H, et al. Discovery of a small molecule activator of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) cardiac K^+ channel. *Mol Pharmacol*. 2005;67(3):827–836. DOI: 10.1124/MOL.104.006577.

67. Zhou J, Augelli-Szafran CE, Bradley JA, et al. Novel potent human ether-à-go-go-related gene (hERG) potassium channel enhancers and their in vitro antiarrhythmic Activity. *Mol Pharmacol*. 2005;68(3):876–884. DOI: 10.1124/MOL.105.014035.

68. Gerlach AC, Stoehr SJ, Castle NA. Pharmacological removal of human ether-à-go-go-related gene potassium channel inactivation by 3-nitro-n-(4-phenoxyphenyl) benzamide (ICA-105574). *Mol Pharmacol*. 2010;77(1):58–68. DOI: 10.1124/MOL.109.059543.

69. Meng J, Shi C, Li L, Du Y, Xu Y. Compound ICA-105574 prevents arrhythmias induced by cardiac delayed repolarization. *Eur J Pharmacol*. 2013;718(1-3):87–97. DOI: 10.1016/J.EJPHAR.2013.09.011.

70. Potet F, Lorinc AN, Chaigne S, et al. Identification and characterization of a compound that protects cardiac tissue from human Ether-à-go-go-related Gene (hERG)-related drug-induced arrhythmias. *J Biol Chem*. 2012;287(47):39613–39625. DOI: 10.1074/JBC.M112.380162.

71. Mannikko R, Bridgland-Taylor MH, Pye H, et al. Pharmacological and electrophysiological characterization of AZSMO-23, an activator of the hERG K^+ channel. *Br J Pharmacol*. 2015;172(12):3112–3125. DOI: 10.1111/BPH.13115.

72. Zhang H, Zou B, Yu H, et al. Modulation of hERG potassium channel gating normalizes action potential duration prolonged by dysfunctional KCNQ1 potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(29):11866–11871. DOI: 10.1073/PNAS.1205266109.

73. Yu Z, Van Veldhoven JPD, 'T Hart IME, Kopf AH, Heitman LH, Ijzerman AP. Synthesis and biological evaluation of negative allosteric modulators of the Kv11.1(hERG) channel. *Eur J Med Chem*. 2015;106:50–59. DOI: 10.1016/J.EJMECH.2015.10.032.

74. Yu Z, Liu J, Veldhoven JPD van, et al. Allosteric Modulation of Kv11.1 (hERG) Channels Protects Against Drug-Induced Ventricular Arrhythmias. *Circ Arrhythmia Electrophysiol*. 2016;9(4):e003439. DOi: 10.1161/CIRCEP.115.003439.

Влияние анксиолитика фабомотизола на временные параметры деполяризации предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда

Смирнова С. Л.[1], Рощевская И. М.[2], Цорин И. Б.[2], Крыжановский С. А.[2]

[1] –Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук», Сыктывкар, Российская Федерация

[2] – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Аннотация. *Цель* работы – изучение методом синхронной многоканальной кардиоэлектрохронотопографии влияния анксиолитика фабомотизола (15 мг/кг, в/в) на деполяризацию предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда. Методом синхронной многоканальной кардиоэлектрохронотопографии исследована последовательность деполяризации эпикарда предсердий беспородных крыс в острейшую фазу инфаркта миокарда, вызванного перевязкой передней ветви левой коронарной артерии при одновременном введении агониста σ1-рецепторов фабомотизола. Выявлены существенные различия временных характеристик деполяризации предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда у контрольных животных и животных, получивших фабомотизол. У крыс на фоне фабомотизола изменения времени начала деполяризации эпикарда, перехода волны возбуждения от правого к левому предсердию и окончания деполяризации по сравнению с исходным состоянием происходят к 5-й минуте после перевязки коронарного сосуда, в процессе дальнейшего развития острого инфаркта миокарда изменения временных параметров не наблюдаются. У животных контрольной группы изменения временных параметров деполяризации предсердий после перевязки коронарного сосуда развиваются к 10-й минуте после перевязки и продолжают изменяться по мере развития острого инфаркта миокарда. Анксиолитик фабомотизол в острейшей фазе инфаркта миокарда изменяет временные параметры деполяризации предсердий, предотвращая развитие фибрилляции предсердий.

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда; эпикард предсердий; деполяризация; агонист σ1-рецепторов фабомотизол

Для цитирования:
Смирнова С. Л., Рощевская И. М., Цорин И. Б., Крыжановский С. А. Влияние анксиолитика фабомотизола на временные параметры деполяризации предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(4):20–25. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-20-25
Поступила: 21 октября 2022 г. **Принята:** 06 ноября 2022 г. **Опубликована:** 24 декабря 2022 г.

Effect of the anxiolytic fabomotizol on the time parameters of atrial depolarization in the acute phase of myocardial infarction

Smirnova SL[1], Roshchevskaya IM[2], Tsorin IB[2], Kryzhanovskii SA[2]

[1] – Federal Research Center "Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences", Syktyvkar, Russian Federation

[2] – FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of the work is to study the effect of the anxiolytic fabomotizole (15 mg/kg, i.v.) on atrial depolarization in the acute phase of myocardial infarction using the method of synchronous multichannel cardioelectrochronotopography. Synchronous multichannel cardioelectrochronotopography was used to study the sequence of depolarization of the atrial epicardium in outbred rats during the acute phase of myocardial infarction caused by ligation of the anterior branch of the left coronary artery with simultaneous administration of the σ1-receptor agonist fabomotizole. Significant differences in the temporal characteristics of atrial depolarization in the acute phase of myocardial infarction were revealed in control animals and animals treated with fabomotizol. In rats against the background of fabomotizol, changes in the time of the onset of epicardial depolarization, the transition of the excitation wave from the right to the left atrium, and the end of depolarization, compared with the initial state, occur by the 5th minute after the ligation of the coronary vessel; in the process of further development of acute myocardial infarction, changes in time parameters are not observed .In animals of the control group, changes in the time parameters of atrial depolarization after coronary vessel ligation develop by 10 minutes after ligation and continue to change as acute myocardial infarction develops. Anxiolytic fabomotizol in the most acute phase of myocardial infarction changes the time parameters of atrial depolarization, preventing the development of atrial fibrillation.

Keywords: acute myocardial infarction; atrial epicardium; depolarization; σ1-receptor agonist fabomotizol

For citations:
Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA. Effect of the anxiolytic fabomotizol on the time parameters of atrial depolarization in the acute phase of myocardial infarction. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(4):20–25. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-20-25
Received: October 21, 2022. **Accepted:** November 06, 2022. **Published:** December 24, 2022.

Введение / Introduction

Инфаркт миокарда левого желудочка – острая социально значимая проблема, приводящая к резкому снижению трудоспособности населения и ранней инвалидизации. Одним из механизмов возникновения фибрилляции предсердий при инфаркте миокарда является повышение давления и растяжение левого предсердия в условиях острой левожелудочковой недостаточности вследствие обширного поражения миокарда [1, 2]. Перенапряжение и дилатация предсердий происходит на фоне перегрузки давлением, что увеличивает нарушения электрофизиологических процессов кардиомиоцитов [3]. Дилатация полостей предсердий способствует повышению риска развития наджелудочковых аритмий и фибрилляции предсердий [4], которая при остром инфаркте миокарда диагностируется более чем в 20 % случаев [5, 3].

Другими факторами риска возникновения фибрилляции предсердий при ОИМ является наличие регургитации митрального клапана и чрезмерная нейрогормональная активация и воспаление [6]. В частности,

острая ишемия приводит к значительному увеличению уровня аденозина, снижению продолжительности потенциала действия, уменьшению рефрактерного периода и возникновению фибрилляции предсердий [7].

В ФБГНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» под руководством академика РАН *Середенина С. Б.* создан и фармакологически изучен оригинальный анксиолитик фабомотизол (афобазол), который кроме анксиолитической активности, обладает кардиопротективным действием [8]. В экспериментах на различных моделях, воспроизводящих острую и хроническую ишемию миокарда, показано, что фабомотизол проявляет выраженную антиишемическую и антиаритмическую активность [9, 10]. Однако механизмы, за счёт которых фабомотизол оказывает антиаритмическое действие, остаются до конца не выясненными.

Цель работы – изучение методом синхронной многоканальной кардиоэлектрохронотопографии влияния анксиолитика фабомотизола на деполяризацию предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда.

Материалы и методы / Materials and methods

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах, массой 250–300 г, которые содержались в виварии в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 09.06.2003 «Об учреждении правил лабораторной практики». Животные были получены из питомника лабораторных животных Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья, и прошли 20-суточный карантин в виварии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Животных содержали в индивидуальных клетках (370 × 200 × 150 мм) в соответствии с нормами размещения в условиях контролируемого освещения (12 ч света / 12 ч темноты) с принудительной 16-кратной в час вентиляцией, при температуре 18–20 °С и относительной влажности воздуха 40–70 % на подстилке из простерилизованных древесных стружек. Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Все манипуляции выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, правилами Европейской Конвенции ETS 123, на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, а также в соответствии с Правилами работы с животными, утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Протокол № 1 от 4 октября 2016 г.). Животные получали стандартный брикетированный корм ПК-120-1 (стандартный брикетированный корм ПК-120-1; ООО «Лабораторснаб», РФ).

Методом синхронной многоканальной кардиоэлектрохронотопографии исследовали последовательность деполяризации эпикарда предсердий беспородных крыс в острейшую фазу инфаркта миокарда на фоне введения фабомотизола.

Животных рандомизировали на 2 группы: животным 2-й группы (n = 9) сразу же после перевязки коронарной артерии вводили фабомотизол (15 мг/кг, в/в) в 0,3 мл изотонического раствора натрия хлорида; а животным 1-й группы (n = 5) – эквивалентный объём изотонического раствора натрия хлорида.

Крыс наркотизировали комбинацией золетила (100 мг/кг, в/м) и уретана (650 мг/кг, в/б), проводили трахеотомию и переводили животных на искусственное дыхание. Частоту и глубину дыхания подбирали индивидуально для каждого животного. После вскрытия грудной клетки и обнажения сердца на эпикард обоих предсердий накладывали многоканальные поверхностные электроды для синхронной регистрации 24 униполярных эпикардиальных электрограмм (ЭГ). Синхронно с эпикардиальными предсердными ЭГ регистрировали биполярные ЭКГ в отведениях от конечностей.

Перевязывали переднюю ветвь левой коронарной артерии на 0,5–1 мм ниже её выхода из-под ушка левого предсердия и одновременно водили животным 1-й группы – физиологический раствор, животным 2-й группы – фабомотизол. Множественные эпикардиальные ЭГ регистрировали до перевязки коронарного сосуда и введения растворов (0 мин) и спустя 2, 5, 10, 15, 20 минут.

Данные обрабатывали при помощи системы «Кардиоинформ» [Рощевский, 2005]. Момент прихода волны возбуждения в каждую точку отведения определяли по минимуму первой производной потенциала по времени и строили хронотопографическую карту последовательности деполяризации предсердий. Время определяли в мс относительно пика R на ЭКГ во II отведении от конечностей.

При проведении экспериментов использовали изотонический раствор натрия хлорида (ПАО «Красфарма», Россия), золетил («Vilbac», Франция), фабомотизол (ERREGIERRE S.p.A., Италия), уретан («Acros Organics», Индия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Отличие показателей в различные временные точки (динамика изменений) проводили с помощью критерия Фридмана и апостериорного критерия Фишера (LSD), а отличие показателей между группами в каждой временной точке с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представляли в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение.

Результаты / Results

До перевязки коронарной артерии волна возбуждения по эпикарду предсердий у всех животных равномерно распространяется от области синусно-предсердного узла, расположенного около верхней полой вены, по правому и левому предсердиям. Спустя 5 ± 1,5 мс после начала возбуждения области верхней полой вены, волна деполяризации по межпредсердной перегородке переходит в среднюю часть левого предсердия. По левому предсердию волна возбуждения распространяется равномерно, деполяризуя ушко левого предсердия. На дорсальной стороне в области лакун лёгочных вен в левом предсердии заканчивается деполяризация обоих предсердий. Длительность деполяризации эпикарда обоих предсердий у всех исследованных крыс составляет 12 ± 4 мс (рис. 1).

У животных контрольной группы выявлено более раннее, по сравнению с исходным состоянием перед перевязкой коронарного сосуда, формирование очага начальной деполяризации на субэпикарде предсердия в области верхней полой вены относительно пика R_{II}. Достоверно более ранним формирование очага начальной деполяризации (за 68 мс (63 ÷ 68 мс пика R_{II})) становится к 10-й минуте ОИМ (см. рис. 1) и сохраняется в течение 20-минутной острейшей фазы ОИМ (68,5 мс (62,7 ÷ 74,5 мс)). После перевязки коронарного сосуда волна возбуждения у контрольных животных переходит с правого на левое предсердие (см. рис. 1) существенно позже, чем в исходном состоянии (52,25 мс (48,25 ÷ 57,25 мс)), к 10-й минуте (62,25 мс (54,5 ÷ 64,5 мс)) изменения становятся достоверными и сохраняются таковыми до 20-й минуты (62,75 мс (54 ÷ 67,25 мс)). Деполяризация правого предсердия заканчивается после перевязки сосуда позже (55 мс (49,75 ÷ 59,5 мс)), изменения становятся достоверными к 10-й минуте ОИМ (61 мс (58,5 ÷ 63 мс)) и остаются увеличенными до окончания эксперимента (63 мс (56,25 ÷ 69,25 мс)). Длительность деполяризации правого предсердия (5 мс (5 ÷ 6,25 мс)), левого (5,25 мс (4,75 ÷ 5,75 мс)), обоих предсердий, с учётом времени перехода (12,5 мс (12,25 ÷ 13 мс)), практически не изменялись после перевязки сосуда. Длительность деполяризации левого предсердия (4 мс (3,75 ÷ 4,75 мс)) и общая длительность деполяризации обоих предсердий (12,5 мс (9,25 ÷ 14 мс)) изменялась после перевязки сосуда незначительно (см. рис. 1).

У крыс опытной 2-й группы, получавших фабомотизол, на 2-й минуте после перевязки сосуда выявлено достоверно более раннее, относительно исходного состояния, формирование области начальной активации в области синусно-предсердного узла (56,25 мс (55,25 ÷ 57,5 мс)). Более раннее формирование области начальной активации сохраняется практически неизменным до окончания эксперимента (60 мс (56 ÷ 62,25 мс)) (см. рис. 1). Переход волны возбуждения с правого на левое предсердие у животных опытной группы происходит существенно раньше относительно исходного состояния, сразу после перевязки коронарного сосуда (50 мс (48,5 ÷ 55,75 мс)) и практически не изменяется в течение дальнейшего развития ОИМ – 53,5 мс (51,5 ÷ 59 мс). Правое предсердие у крыс 2-й группы полностью деполяризуется существенно раньше (53 мс (49 ÷ 53 мс)), чем в исходном состоянии до перевязки (48 мс (47,5 ÷ 50 мс)), начиная со 2-й минуты ОИМ, но практически не изменяется в течение последующих 18 минут (52 мс (50,25 ÷ 58,5 мс)). Время окончания деполяризации левого предсердия изменяется аналогичным образом: от исходного состояния (44,25 мс (42,25 ÷ 47 мс) достоверно изменяется ко 2-й минуте после перевязки (47 мс (43,5 ÷ 51,25 мс)) и остаётся неизменным до окончания 20-минутного периода.

У животных, получавших фабомотизол и физиологический раствор, после перевязки коронарного сосуда длительность деполяризации правого, левого, обоих предсердий практически не изменялась на протяжении всего периода наблюдения. У животных, получавших фабомотизол, длительность деполяризации предсердий составила в исходном состоянии: правого (4 мс (3,25 ÷ 7,5 мс)), левого (5,25 мс (4,5 ÷ 5,5 мс)), обоих предсердий (10,5 мс (8,5 ÷ 12,5 мс), спустя 20 минут после воспроизведения ОИМ: правого – 4,5 мс (4,25 ÷ 5,5 мс), левого – 5,5 мс (3,5 ÷ 6 мс), обоих предсердий – 11 мс (8,5 ÷ 13,75 мс).

Обсуждение / Discussion

Исследования выявили существенные различия во временных характеристиках деполяризации предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда у контрольных животных и животных, получивших фабомотизол.

У контрольных животных с ОИМ на первых минутах после окклюзии сосуда момент образования области начальной активации на эпикарде в зоне синусно-предсердного узла практически не изменяется, а начиная с 5 минуты воздействия, время достоверно увеличивается по сравнению с исходным состоянием. У животных, получавших фабомотизол, образование области начальной активации на эпикарде в зоне синусно-предсердного узла на 1-й минуте после окклюзии происходит раньше, чем в до перевязки, но далее практически не изменяется (см. рис. 1).

Начиная с 5-й минуты после окклюзии коронарного сосуда, выявлена существенная разница во времени формирования области начальной активации между животными, получавшими физиологический раствор и фабомотизол: у контрольных животных волна возбуждения переходит с правого на левое предсердие в первые минуты после окклюзии сосуда практически в то же время, что и в исходном состоянии, а с 10-й минуты – существенно раньше; у крыс, получавших фабомотизол, время перехода волны возбуждения с правого на левое предсердие в период с 10-й по 20-ю минуту после перевязки сосуда практически не изменяется (см. рис. 1),

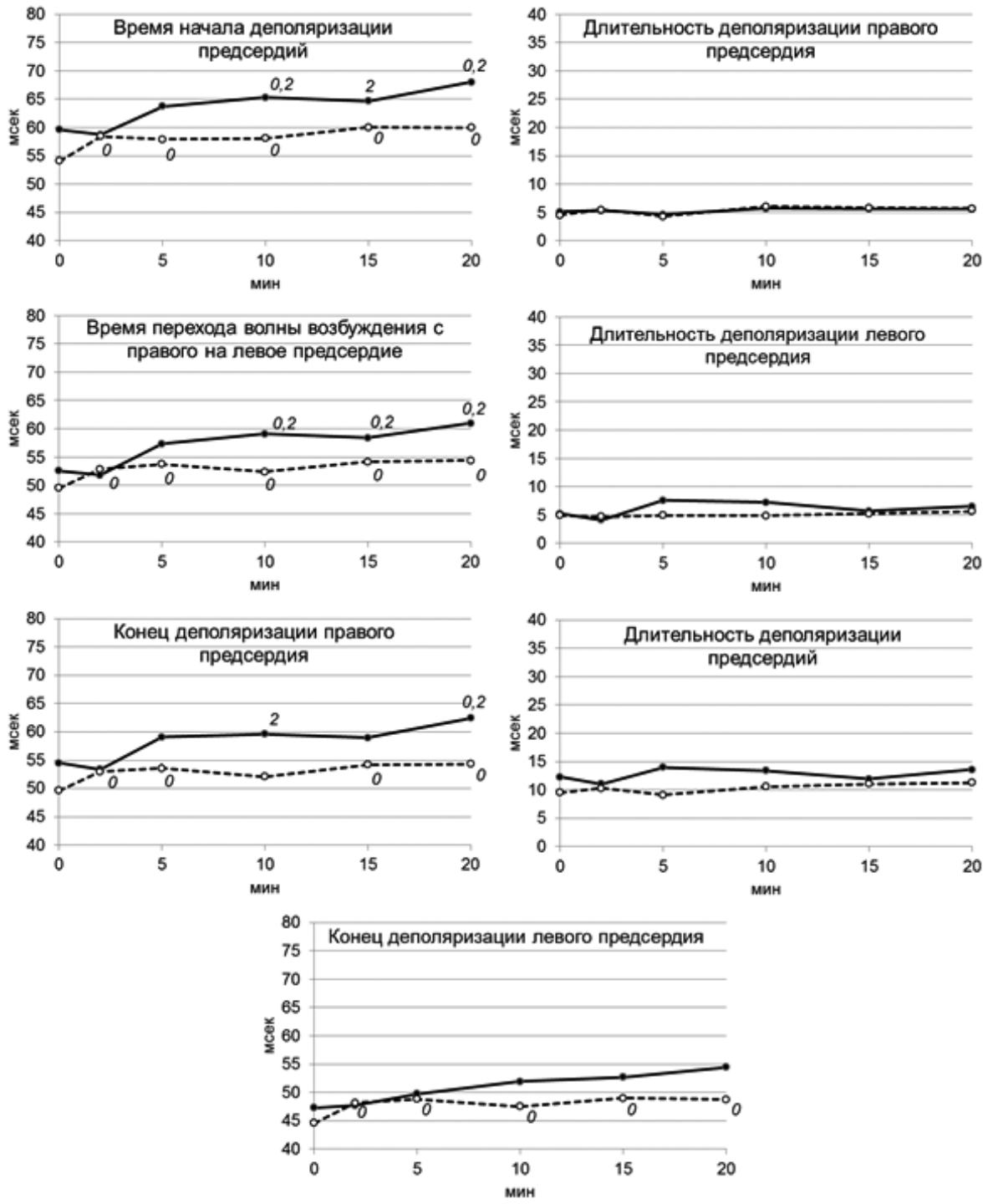


Рис. 1. Динамика изменения временных показателей деполяризации эпикарда предсердий крыс в острейшую фазу инфаркта миокарда у контрольных животных и получавших фабомотизол

Примечания: По оси ординат на графиках «время начала деполяризации предсердий», «время перехода волны возбуждения с правого на левое предсердие», «конец деполяризации правого предсердия» и «конец деполяризации левого предсердия» указано абсолютное время в мс до пика зубца R_{II}; Сплошная линия – контрольные животные, пунктирная линия – животные получавшие фабомотизол; 0, 2 – различия значимы по сравнению с показателем у интактных животных (0) и 2-й минуте (2) после перевязки коронарной артерии (апостериорный критерий Фишера) $p < 0{,}05$.

Fig. 1. Dynamics of changes in time parameters of depolarization of the atrial epicardium in rats in the acute phase of myocardial infarction in control animals and with the introduction of fabomotizole

Notes: The y-axis on the graphs «time of onset of atrial depolarization», «time of transition of the excitation wave from the right to the left atrium», «end of depolarization of the right atrium» and «end of depolarization of the left atrium» shows the absolute time in ms to the peak of the R_{II} wave; Solid line – control animals, dotted line – animals receiving the fabomotizol; 0, 2 – differences are significant compared with the data in intact animals (0) and at the 2nd minute (2) after coronary artery ligation (Fisher's posterior test), $p < 0.05$.

что свидетельствует о разнонаправленном изменении времени перехода волны возбуждения у животных контрольной и опытной групп.

Изменение времени окончания деполяризации правого предсердия у животных контрольной и опытной группы также происходит разнонаправлено: начиная с 5-й минуты после окклюзии коронарного сосуда изменения времени окончания деполяризации правого предсердия становятся существенно большими у контрольных крыс с ОИМ, тогда как у животных, получивших фабомотизол, практически не изменяются (см. рис. 1).

У контрольных крыс в острейшую фазу инфаркта миокарда, в отличие от крыс, получивших фабомотизол, наблюдается существенное увеличение времени: начала деполяризации эпикарда предсердий; перехода волны возбуждения от правого к левому предсердию; окончания деполяризации предсердий в течение 20 минут после пережатия коронарного сосуда, тогда как у крыс, получивших фабомотизол, после 5-й минуты после воспроизведения ОИМ не происходит дальнейшего изменения времени начала деполяризации эпикарда предсердий, перехода волны возбуждения от правого к левому предсердию и окончания деполяризации предсердий.

Ранее в модельных экспериментах, воспроизводящих аконитиновую, хлоридкальциевую, ваготоническую и реперфузионную аритмии, было показано, что анксиолитик фабомотизол (10–15 мг/кг, в/в) проявляет выраженную антиаритмическую активность [11, 12]. Антиаритмические эффекты фабомотизола реализуются на уровне сердечной мышцы и полностью блокируются антагонистами σ1-рецепторов [13]. При помощи метода множественного картирования электрического поля сердца изучены тонкие электрофизиологические механизмы, лежащие в основе антиаритмического действия фабомотизола. Эти результаты позволяют говорить о том, что анксиолитик фабомотизол в условиях острой ишемии миокарда может предотвратить/купировать фибрилляцию предсердий. Полученные данные хорошо согласуются с результатами ранее проведённых экспериментов, свидетельствующих о том, что фабомотизол эффективно препятствует развитию фибрилляции предсердий на модели ваготонической фибрилляции предсердий у кошек [12], и данными о том, что систематическая экспериментальная терапия агонистом σ1-рецепторов соединением SA4503 препятствует развитию фибрилляции предсердий у крыс с депрессией [14].

Изменения внутри- и межпредсердного проведения возбуждения могут играть важную роль в возникновении и поддержании фибрилляции предсердий. Сглаживание фабомотизолом выявленных изменений соотношений деполяризации правого и левого предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда свидетельствует о наличии у препарата антиаритмического действия.

Заключение / Conclusion

Выявлены существенные различия во временных характеристиках деполяризации предсердий в острейшую фазу инфаркта миокарда у животных, получивших фабомотизол, и контрольных животных. У крыс, получивших фабомотизол, основные изменения временных параметров деполяризации предсердий происходят только в течение первых пяти минут после перевязки коронарного сосуда и введения препарата. В период дальнейшего развития острейшей фазы инфаркта миокарда изменений временных параметров деполяризации предсердий не происходит. У контрольных крыс в острейшую фазу инфаркта миокарда, в отличие от крыс, получивших фабомотизол, наблюдается существенное увеличение времени: начала деполяризации эпикарда предсердий; перехода волны возбуждения от правого к левому предсердию; окончания деполяризации предсердий с 10-й по 20-ю минуты после пережатия коронарного сосуда. Таким образом показано, что анксиолитик фабомотизол в условиях острейшей фазы инфаркта миокарда может предотвратить развитие фибрилляции предсердий.

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

Смирнова Светлана Леонидовна
e-mail: smirnova.sl@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4292-2444
SPIN-код: 7341-0013
к. б. н., зав. отделом сравнительной кардиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Российская Федерация

Smirnova Svetlana L.
e-mail: smirnova.sl@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4292-2444
SPIN code: 7341-0013
PhD, Cand. Sci. Biology, head of the department Comparative Cardiology FRC Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russian Federation

Рощевская Ирина Михайловна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: compcard@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-6108-1444
SPIN-код: 5424-2991
д. б. н., член-корреспондент РАН, г. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Roshchevskaya Irina M.
Corresponding author
e-mail: compcard@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-6108-1444
SPIN code: 5424-2991
Dr. Sci. (Biol.), Corresponding Member RAS, Chief Researcher of the Laboratory of Pharmacological Screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

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

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

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

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

Список литературы / References

1.Sugiura T, Iwasaka T, Takahashi N, et al. Atrial fibrillation in inferior wall Q-wave acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1991;67(13):1135–1136. DOI: 10.1016/0002-9149(91)90879-p.

2. Tilling L, Clapp B. Atrial fibrillation in myocardial infarction: predictors and prognosis. *Int J Clin Pract*. 2009;63(5):680–682. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2009.02061.x.

3. Шевченко А.С., Щукина Е.В., Алешечкин П.А. Влияние электрической активности миокарда на формирование фибрилляции предсердий у пациентов в постинфарктный период. *Актуальные проблемы медицины*. 2022;45(2):141–151. [Shevchenko AS, Schukina EV, Alyoshechkin PA Influence of electrical activity of the myocardium on the formation of atrial fibrillation in patients in the postinfarction period. *Challenges in Modern Medicine*. 2022;45(2):141–151. (In Russ).]. DOI: 10.52575/2687-0940-2022-45-2-141-151.

4. Schnabel RB, Yin X, Gona P, et al. 50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study. *The Lancet*. 2015;386(9989):154–162. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61774-8.

5. Бородашкина СЮ, Протасов КВ. Клинико-патогенетические особенности инфаркта миокарда у больных фибрилляцией предсердий. *Сибирское медицинское обозрение*. 2020;(5):31–39. [Borodashkina SY, Protasov KV. Clinical and pathogenetic features of myocardial infarction in patients with atrial fibrillation. *Siberian Medical Review*. 2020;(5):31–39. (In Russ).]. DOI: 10.20333/2500136-2020-5-31-39.

6. Bahouth F, Mutlak D, Furman M, et al. Relationship of functional mitral regurgitation to new-onset atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *Heart*. 2010;96(9):683–688. DOI: 10.1136/hrt.2009.183822.

7. Kabell G, Buchanan LV, Gibson JK, et al. Effects of adenosine on atrial refractoriness and arrhythmias. *Cardiovasc Res*. 1994;28(9):1385–1389. DOI: 10.1093/cvr/28.9.1385.

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

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

10. Цорин И.Б., Барчуков В.В., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А., Середенин С.Б. Изучение противоишемической активности фабомотизола гидрохлорида в условиях эндотелиальной дисфункции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;167(5):573–576. [Tsorin IB, Barchukov VV, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA, Seredenin SB. Anti-ischemic activity of fabomotizole hydrochloride under conditions of endothelial dysfunction. *Bull Experim Biol Med*. 2019;167(5):634–636. (In Russ).]. DOI: 10.1007/ s10517-019-04586-x.

11. Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А. Изучение эффектов афобазола на модели реперфузионных аритмий. Вестник *Российской академии медицинских наук*. 2010;(4):41–45. [Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA. Investigation of Afobasol Effects on a Model of Reperfusion Arrhythmias. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2010;(4):41–45. (In Russ).].

12. Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Крыжановский С.А. Оценка эффективности афобазола на модели ваготонической фибрилляции предсердий. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2010;(4):49–52. [Stolyaruk VN, Vititnova MB, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA. Evaluation of Afobasol Efficiency on a Model of Vagotonic Atrial Fibrillation. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2010;(4):49–52. (In Russ).].

13. Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Крыжановский С.А. Изучение противофибрилляторной активности афобазола у животных с интактным и денервированном миокардом. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2010;(4):45–48. [Stolyaruk VN, Vititnova MB, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA. Study of the antifibrillatory activity of afobazole in animals with intact and denervated myocardium. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2010;(4):45–48. (In Russ).].

14. Liu X, Qu C, Yang H, et al. Chronic stimulation of the Sigma-1 receptor ameliorates autonomic nerve dysfunction and atrial fibrillation susceptibility in a rat model of depression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(6): H1521-H1531. DOI: 10.1152/ajpheart.00607.2017.

Количественное определение содержания венлафаксина и его активного метаболита в плазме крови человека посредством хроматомасс-спектрометрии

Кузьмин И. И.[1], Платова А. И.[1], Константинова А. С.[2], Мирошниченко И. И.[1]

[1] – ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Российская Федерация

[2] – ООО «ЛАБИНВЕСТ», Москва, Российская Федерация

Аннотация. Предложен валидированный метод количественного определения венлафаксина и О-десметилвенлафаксина в плазме крови человека посредством жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Пробоподготовку проводили жидкофазной экстракцией с поддержкой (SLE, от англ. «supported liquid extraction») с использованием картриджей HyperSEP и промывкой 3-метилбутиловым эфиром. Для измерения содержания целевых веществ использовали тройной квадрупольный масс-спектрометр в режиме детектирования заданных масс (+MRM) в условиях ионизации электрораспылением. Калибровочные кривые носили линейный характер (коэффициент достоверности аппроксимации $r^2 > 0{,}999$). Валидация метода свидетельствовала о достаточно высокой чувствительности, специфичности, правильности и воспроизводимости, а также стабильности аналитов при замораживании–оттаивании и хранении при температуре –20 °С. Метод разработан для применения в терапевтическом лекарственном мониторинге (ТЛМ).

Ключевые слова: венлафаксин; о-десметилвенлафаксин; хроматомасс-спектрометрия; жидкофазная экстракция с поддержкой

Для цитирования:
Кузьмин И. И., Платова А. И., Константинова А. С., Мирошниченко И. И. Количественное определение содержания венлафаксина и его активного метаболита в плазме крови человека посредством хроматомасс-спектрометрии. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(4):26–32. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-26-32
Поступила: 21 октября 2022 г. **Принята:** 01 ноября 2022 г. **Опубликована:** 24 декабря 2022 г.

Quantitative determination of the content of venlafaxine and its active metabolite in human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry

Kuzmin II[1], Platova AI[1], Konstantinova AS[2], Miroshnichenko II[1]

[1] – FSBSI "Mental Health Research Center", Moscow, Russian Federation

[2] – LABINVEST LLC, Moscow, Russian Federation

Abstract. A validated method for the quantitative determination of venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine in human plasma by tandem liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC/MS/MS) has been proposed. Sample preparation was carried out by liquid-phase extraction with support (SLE, from "supported liquid extraction") using HyperSEP cartridges and washing with 3-methylbutyl ether. The measure of the target analytes was carried on a triple quadrupole mass spectrometer under multiple-reaction monitoring (+MRM) mode with the electrospray ionization. The calibration curves were linear with regression coefficient $r^2 > 0.999$. The method validation was showed high sensitivity, specificity, accuracy and reproducibility, as well as stability of analytes after freeze/thaw cycles and storage at –20 °C. The method is developed for using in therapeutic drug monitoring.

Keywords: venlafaxine; O-desmethylvenlafaxine; chromatomass spectrometry; support liquid phase extraction

For citations:
Kuzmin II, Platova AI, Konstantinova AS, Miroshnichenko II. Quantitative determination of the content of venlafaxine and its active metabolite in human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(4):26–32. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-26-32
Received: October 21, 2022. **Accepted:** November 01, 2022. **Published:** December 24, 2022

Введение / Introduction

1-[2-(Диметиламино)-1-(4-метоксифенил)этил] циклогексанол или венлафаксин — антидепрессант, селективный ингибитор обратного захвата серотонина и норадреналина [1]. Абсорбция венлафаксина в желудочно-кишечном тракте составляет около 92 %, однако из-за пресистемного метаболизма его биодоступность снижается до 12,6 % [2].

Венлафаксин в основном метаболизируется цитохромом 2D6 с образованием активного метаболита О-десметилвенлафаксина (ODV), который биотрансформируется с участием CYP3A4, CYP2C19 и UGT (уридин-5-дифосфат глюкуронилтрансферазы), не образуя активных метаболитов. Кроме того, в метаболизм венлафаксина вносят вклад цитохромы CYP2C19, CYP2C9, и CYP3A4 [3].

Как и венлафаксин (VFX), так его активный метаболит, О-десметилвенлафаксин (ODV), являются рацематами. R-VFX (рацемат R-энантиомеров) ингибирует как обратный захват норадреналина, так и серотонина, в то время как S-VFX (рацемат S-энантиомеров) ингибирует только обратный захват серотонина. R- и S-VFX метаболизируются до R- и S-О-десметилвенлафаксина, соответственно. Фармакокинетика энантиомеров VFX, включая метаболизм, также стереоселективна. Несмотря на имеющиеся стереоселективные методики (ВЭЖХ с УФ детектированием, капиллярный электрофорез и ВЭЖХ-МС/МС), их применение в терапевтическом лекарственном мониторинге (ТЛМ) остаётся длительным и трудозатратным [4].

Вместе с тем, степень сопоставимости фармакологических профилей энантиомеров ODV и VFX [4] позволяет применять нестереоселективные подходы,

отвечающие более актуальным требованиям лекарственного мониторинга, таким как простота, скорость и экономическая эффективность.

Медленный метаболизм, опосредованный полиморфизмом цитохрома CYP2D6, может приводить к токсичному уровню препарата в крови, а его доля в индоевропейской популяции существенна (5–10 %) [5]. Лекарственный мониторинг помогает выявлять фенотип медленного или ультрабыстрого метаболизма CYP2D6 по соотношению метаболит–исходное вещество (MPR) вне пределов нормального диапазона 2,7–7,7 [6].

Линейность кинетики VFX и ODV в терапевтическом диапазоне суточных доз 75–450 мг обеспечивает достижение равновесных концентраций при курсовом приёме уже через 3-е суток. Периоды полувыведения у венлафаксина (4–14 ч.) и ODV (10–20 часов) сравнительно короткие — меньше интервала дозирования 24 ч, что требует мониторинга их остаточного уровня, влияющего на выраженность антидепрессивного эффекта [7].

Активный метаболит (АМ) в совокупности с родительским веществом составляют суммарную фракцию венлафаксина, терапевтический коридор которой установлен как 100–400 нг/мл. Концентрация выше 222 нг/мл является прогностической для принятия врачебных решений, а уровень выше 800 нг/мл требует срочного вмешательства (laboratory alert) [8].

Клиренс, рассчитываемый на основе остаточных концентраций (C_{min}) АМ, определяется активностью CYP 2D6 и CYP 2C19 и зависит от возраста. Поэтому высокие значения АМ венлафаксина обычно связаны с лекарственными взаимодействием и возрастом.

Очевидно, что безопасность назначения VFX определяется не только режимом дозирования, но и индивидуальными характеристиками (например, статус метаболизма по цитохромам 2D6 и 2C19, возраст), что объясняет необходимость ТЛМ. Другим показанием для ТЛМ венлафаксина является переключение терапии с оригинального препарата на непатентованную форму и наоборот, чреватой потерей эффективности или проблемами с переносимостью [9, 10].

Немаловажной предпосылкой для разработки быстрой и эффективной методики количественного обнаружения венлафаксина является рост в России числа отравлений, выделяющихся своей тяжестью и весомой долей среди других психотропных средств, что связано с немедицинским применением венлафаксина [11].

Резюмируя вышесказанное, становится понятным интерес к поиску аналитических методов, удовлетворяющих требованиям ТЛМ.

Для анализа венлафаксина и его активного метаболита доступно множество методов: газовая хроматография с масс-спектрометрией (ГХ-МС) [12], высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с УФ-детекцией [13], ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией [14], а также применяется ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) [15].

При этом некоторые методики не подходят для ТЛМ из-за недостаточной чувствительности, другие требуют сложную многоступенчатую очистку и дериватизацию – дорогостоящие и отнимающие много времени подходы. В большинстве опубликованных методов в качестве внутреннего стандарта применяется дейтерированный аналог, что удорожает исследование, а в настоящее время, в целях импортозамещения, подбор внутреннего стандарта (ВС) из других соединений и вовсе имеет первостепенное значение.

Наиболее широко применяемые методы подготовки проб образцов плазмы крови – жидкость-жидкостная, твёрдофазная экстракция (ТФЭ) и осаждение белков. Жидкость-жидкостная экстракция в традиционном формате трудоёмка, отнимает много времени, а также снижает прецизионность за счёт ручного фактора. ТФЭ и осаждение белков, в свою очередь, хорошо нивелируют эффект матрицы. В последнее время все шире применяется жидкофазная экстракция с поддержкой (SLE), сочетающая преимущества жидкостной экстракции и ТФЭ: получение более чистых образцов (снижение содержания фосфолипидов с устранением матричного эффекта), лучшая воспроизводимость и сокращение времени пробоподготовки [16].

Золотым стандартом в количественном лекарственном анализе является метод ВЭЖХ-МС/МС, имеющий несколько общих биоаналитических проблем, таких как матричный эффект, интерференция, низкое извлечение и воспроизводимость. Среди этих проблем матричный эффект является одной из самых сложных и трудных для решения. Матричный эффект наблюдается вследствие влияния на сигнал МС-детектора эндогенных компонентов матрицы: солей и поверхностно-активных веществ, особенно фосфолипидов. Причём последние трудно хроматографически отделить из-за широкого диапазона полярности. Поэтому эффективное удаление фосфолипидов с помощью SLE пробоподготовки становится критичным для минимизации матричного эффекта [16].

Универсальным аспектом пробоподготовки является подбор буферного раствора для достижения целевого pH, минимизирующего ионизацию молекул аналита для оптимизации экстракции. Для этого на основе pKa функциональных групп в молекулах целевых аналитов рассчитывают целевой pH. VFX и ODV обладают выраженными основными свойствами, что обычно требует буферизации 1 % гидроксидом аммония образца плазмы на 2 единицы выше приведённых в таблице величин pKa (табл. 1).

Таблица 1

Кислотно-основные свойства изучаемых аналитов

Table 1

The acid-base properties of the analytes under study

Константа ионизации (pKa)	VFX	ODV
Наиболее сильная кислотная функциональная группа молекулы pKa (Strongest Acidic)	14,42	10,11
pKa кислоты, сопряжённой с самой сильной основной группой (Strongest Basic)	8,91	8,87

Картриджи HyperSep SLE pH 9 (Thermo) помимо содержания кремнезема, снижающего содержание примесей в элюате, имеет уровень кислотности, оптимизированный для элюирования соединений с основными свойствами.

Данная работа посвящена оптимизации метода ВЭЖХ-МС/МС для измерения концентрации венлафаксина и его активного метаболита О-десметилвенлафаксина в плазме крови человека для применения в ТЛМ или токсикологии [17]. Ведущим подходом в оптимизации являлось применение жидкофазной экстракции с поддержкой на основе картриджей HyperSep SLE pH 9 (Thermo). В качестве внутреннего стандарта использовали метопролол (рис. 1).

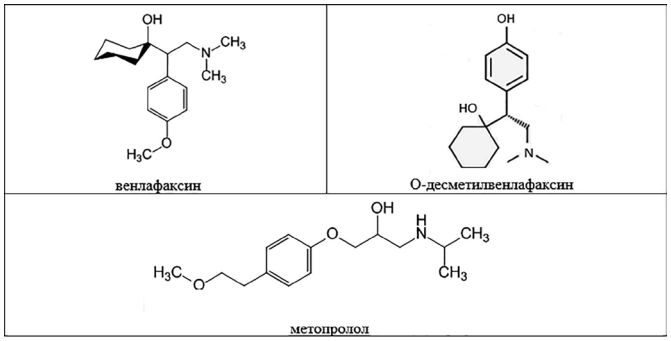


Рис. 1. Венлафаксин, О-десметилвенлафаксин и внутренний стандарт (метопролол)
Источник: База данных DrugBank. Ссылка: https://go.drugbank.com/
Fig. 1. Venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine and the internal standard (metoprolol).
Source: DrugBank database. Link: https://go.drugbank.com/

Материалы и методы / Materials and methods

Препараты, реактивы и оборудование / Substances, reagents and equipment

Субстанция венлафаксина произведена компанией «Sigma» (США), О-десметилвенлафаксина – Toronto Research Chemical (Канада). Субстанция метопролола предоставлена ЗАО «Исследовательский институт химического разнообразия», Химки, Московская область.

Остальные реактивы были аналитического качества: муравьиная кислота (Sigma Inc., США), метанол и ацетонитрил (Lab-Scan, Польша), деионизированная вода, полученная из дистиллированной воды с использованием системы Simplicity UV (Millipore, США). Патроны HyperSEP SLE 200MG/3ML/50PKG (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Для производства азота особой чистоты использовался генератор NitroFlow Lab фирмы Parker Filtration (Нидерланды). Для равномерного перемешивания проб применялся вибровстряхиватель типа «Vortex» фирмы Labomed (Швейцария). В исследовании также применялись электронные весы Ohaus Discovery (Ohaus Europe, Швейцария).

Обработка проб / Sample Preparation

Перед началом анализа проходила процедура подготовки патронов HyperSEP. Водный образец вносился пипеткой в патрон. Для более эффективной абсорбции с помощью специального оборудования дополнительно создавались импульсы в вакууме в течение пяти минут.

Для проведения анализа в стеклянные пробирки объёмом 5 мл отбирали 500 мкл плазмы, добавляли 50 мкл стандарта смеси двух веществ, 50 мкл раствора IS и 500 мкл воды. Далее пробирки перемешивали на вибровстряхивателе типа вортекс в течение 15 секунд. Для SLE патронов HyperSEP загружали 1 мл супернатанта. Элюирование целевого вещества осуществляли 2 мл не смешивающегося с водой растворителя – третбутилметилового эфира (ТМБЭ), также с применением вакуумных импульсов. Элюент переносили в пробирки и выпаривали в токе азота при 40 °С. Сухой остаток растворяли в 200 мкл метанола. Объём вводимой пробы – 2 мкл.

Условия хроматомасс-спектрометрического определения / Conditions for Chromatography-Mass Spectrometric Determination

Анализ образцов проводился на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000 (США), включающем дегазатор, бинарный насос, автоинжектор, термостаты автоинжектора и модуля колонок, спектрофотометрический детектор с диодной матрицей, совмещённый с квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantiva (Thermo Scientific, США). При анализе использовался метод ионизации электрораспылением (ESI). Программное обеспечение – Xcalibur.

Условия хроматографического анализа / Conditions for Chromatography Analysis

Стационарная фаза – колонка «Hypersil GOLD – C18» фирмы Thermo Scientific Inc., США (50 × 2,1 мм; 1.9 мкм) с предколонкой 12,5 мм × 4,6 мм.

Подвижная фаза состояла из 0,2 % муравьиной кислоты в ацетонитриле, и 0,2 % раствора муравьиной кислоты в воде. Насос работал в градиентном режиме (табл. 2).

Таблица 2

Градиентный режим ВЭЖХ

Table 2

The gradient mode in HPLC

Время, мин	Поток (мл/мин)	0,2 % раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле	0,2 % раствора муравьиной кислоты в воде
0	0,2	15	85
0,5	0,2	15	85
7	0,2	85	15
10	0,2	15	85
12	0,2	15	85
12	Остановка анализа		

Скорость подвижной фазы – 0,2 мл/мин; объём пробы, вводимой в аналитическую систему – 2,0 мкл; температура термостата колонки – 30 °С. В указанных условиях время удерживания венлафаксина составило 4,9 ± 0,2 мин, О-десметилвенлафаксина – 1,5 ± 0,1 мин, метопролола (IS) – 2,1 ± 0,1 мин. Предел обнаружения венлафаксина в пробах составил 1,0 нг/мл, О-десметилвенлафаксина – 1,0 нг/мл.

Режим работы масс-детектора / Mass Detector Operating Mode

Детектор работал в режиме мониторинга заданных масс с положительной ионизацией. Для каждого аналита и ВС оптимизировали параметры работы масс-детектора. Напряжение электрораспыления – 4200 В. Для диссоциации молекул в ячейке соударений использовали аргон под давлением 0,15 МПа.

Калибровочные стандарты и образцы контроля качества / Calibration Standards and Quality Control Samples

Маточные растворы венлафаксина и О-десметилвенлафаксина концентрацией 1,0 мг/мл, получали растворением соответствующей навески в метаноле. Из полученного раствора смеси этих двух веществ с концентрацией каждого 100 мкг/мл готовили стандартные растворы (1; 5; 10; 50; 100; 250 и 500 нг/мл) последовательным разведением метанолом. Образцы контроля качества (QC) низкой, средней и высокой концентрации (12,5; 125; 400 нг/мл) готовили подобным образом. Маточный раствор IS (1 мг/мл) в метаноле разбавляли метанолом до конечной концентрации – 500 нг/мл. Маточные растворы хранили при температуре 4 °С и использовали в течение месяца после приготовления. Калибровочные стандарты и образцы QC готовили добавлением 50 мкл стандартного раствора, содержащего оба определяемых вещества, и 50 мкл раствора IS к 500 мкл плазмы.

Валидация метода / The method validation

Валидацию метода проводили в соответствии с требованиями к биоаналитическим методам, разработанными в Управлении по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США [18].

Проводя скрининг шести образцов плазмы человека разного происхождения, заведомо не содержащих аналиты, оценивали специфичность метода. Каждый образец анализировали на интерференцию, применяя предложенную процедуру подготовки образцов и условий хроматомасс-спектрометрического определения, а затем сравнивали результаты с полученными для раствора аналитов в чистом растворителе в концентрациях, близких к калибровочным.

Эффект влияния матрицы на ионизацию искомых веществ оценивали путём сравнения площадей пиков каждого из аналитов в образце плазмы с площадями пиков, полученными для этих же веществ в мобильной фазе. Оценили три различных уровня концентрации определяемых веществ (12,5; 125; 400 нг/мл) путём анализа образцов на каждом из этих уровней. Контрольные образцы плазмы, используемые в этом исследовании, – пять различных проб от здоровых людей.

Для определения диапазона линейности использовали стандартные калибровочные кривые концентраций из 8 точек (от 0 до 500 нг/мл).

Правильность и прецизионность метода в пределах одного дня (intra-day) оценивались путём анализа пяти контрольных образцов (QC) – микса аналитов на трёх уровнях (12,5; 125; 400 нг/мл). Правильность и прецизионность в различные дни экспериментов (inter-day) определяли анализом 15 QC образцов в течение трёх последовательных дней. При определении прецизионности и правильности использовали 15 % интервал от фактических концентраций.

Степень экстракции каждого из определяемых веществ оценивали путём сравнения средних площадей их пиков после анализа стандартных образцов контроля качества, подвергнутых процедуре пробоподготовке, описанной выше, при низком, среднем и высоком уровнях концентраций (12,5; 125; 400 нг/мл) со средними площадями пиков стандартов в метаноле в тех же концентрациях.

Для определения чувствительности использовали самую низкую концентрацию аналитов, при которой прецизионность и правильность были меньше или равны 20 %, а соотношение сигнала к шуму (S/N) было больше 10. Оценивали также воспроизводимость и прецизионность метода.

Для оценки стабильности образцов при замораживании–оттаивании определяли стабильность QC образцов для трёх уровней концентраций венлафаксина, О-десметилвенлафаксина в плазме после трёх циклов замораживания (-20 °С) и оттаивания (при комнатной температуре).

Результаты и обсуждение / Results and Discussion

Условия масс-спектометрии / Mass Spectrometry Conditions

Для всех аналитов были тщательно оптимизированы параметры масс-детектора. В качестве ВС был выбран метопролол, поскольку его хроматографические характеристики и степень извлечения близки к определяемым веществам. Были подобраны условия масс-спектрометрического детектирования, дающие наибольшую чувствительность определения: напряжение на капилляре электро-спрея – 3500 В, время задержки (dwell time) – 100 мс, температура оболочечного газа – 358 °С, температура ион-трансферного капилляра – 342 °С. Во время анализа скорости потока газа (азота) были различными: скорость оболочечного газа – 45 мл/мин., вспомогательного газа – 13 мл/мин. В ячейке соударений использовали аргон: под давлением 0,2 Па. Времена удерживания, материнские (**precursor**) и дочерние (**product**) ионы, а также энергии соударений (collision energy, CE) для аналитов и внутреннего стандарта приведены в табл. 3.

Таблица 3

Параметры режима детектирования заданных масс

Table 3

Multiple Reaction Monitoring parameters

Аналит	Время удерживания, мин	Полярность	Precursor, m/z	Product, m/z	CE
Венлафаксин	4,9 ± 0,2	Положительная	278	260	7
О-десметилвенлафаксин	1,5 ± 0,1	Положительная	264	246	7
Метопролол (ВС)	2,1 ± 0,1	Положительная	268	116	30

Для достижения приемлемого хроматографического разделения и максимального ионизационного отклика определяемых аналитов исследовали несколько вариаций компонентов мобильной фазы (метанол, ацетонитрил, вода, муравьиная кислота, ацетат аммония). В результате пришли к выводу, что мобильная фаза из ацетонитрила с 0,2 % муравьиной кислотой является оптимальной при выборе соответствующего градиента. Типичная масс-спектрограмма изучаемых веществ показана рис. 2.

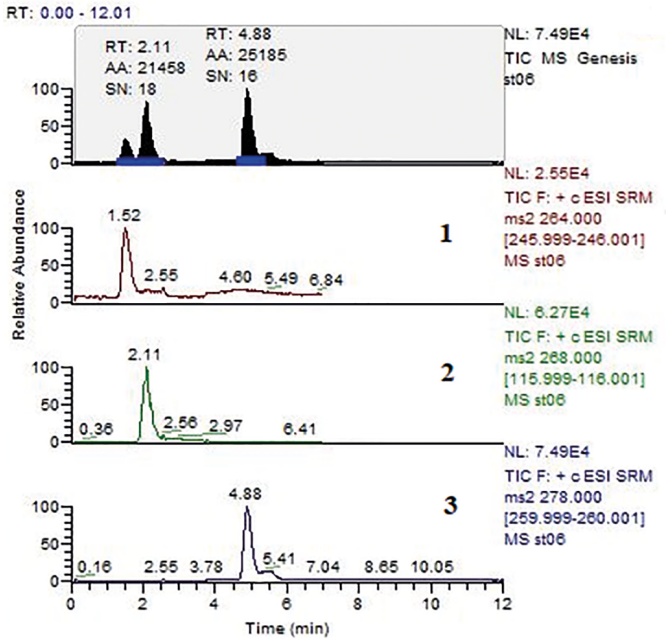


Рис. 2. Хроматограмма в режиме полного ионного тока: 1 – О-десметилвенлафаксин; 2 – метопролол (ВС); 3 – венлафаксин.

Fig. 2. Total ion current (TIC) chromatogram: 1 – O-desmethylvenlafaxine; 2 – metoprolol (internal standard); 3 – venlafaxine

Результаты валидации метода / Method Validation Results

Путём построения калибровочных кривых концентраций для стандартных образцов венлафаксина, О-десметилвенлафаксина, арипипразола, дегидроарипипразола в диапазоне концентраций от 1 до 500 нг/мл установили, что зависимости отношения площади пиков аналита / ВС (y) от концентрации определяемых веществ (x) от описывается линейными уравнениями:

– для венлафаксина: $y = 0{,}2399 \cdot x$ с коэффициентом достоверности аппроксимации $r^2 = 0{,}9998$;

– для О-десметилвенлафаксина: $y = 0{,}1156 \cdot x$, $r^2 = 0{,}9995$;

С пиками венлафаксина и О-десметилвенлафаксина не интерферировали пики коэкстрактивных веществ матрицы. Степень экстракции венлафаксина составила 68 %, О-десметилвенлафаксина – 71 %, и, как свидетельствуют данные, была удовлетворительной, точной и воспроизводимой.

Сходимость (прецизионность) измерений (CV) для трёх концентраций каждого из определяемых веществ (в пределах одного дня и в разные дни) была в пределах нормы. Соответствующие данные прецизионности и правильности представлены в табл. 4.

Селективность проверяли путём измерения шести образцов плазмы разного происхождения, не содержащих искомых веществ. В образцах не было обнаружено значимого количества эндогенных веществ при временах удерживания на колонке, соответствующих пикам венлафаксина, О-десметилвенлафаксина и метопролола.

Матричный эффект проверяли на трёх вышеуказанных концентрациях – 12,5 нг/мл, 125 нг/мл и 400 нг/мл. Отношение площадей пиков аналитов в экстракте плазмы и мобильной фазе составило для венлафаксина – 89,2 %, 94,5 %, 93,8 %; для О-десметилвенлафаксина – 88,6 %, 95,1 %, 90,1 %. Стабильность образцов во время проведения анализа обеспечивалась использованием термостатированного автоинжектора при температуре 10 °С.

Аналиты в трёх концентрациях были стабильны в плазме в течение трёх проанализированных циклов замораживания (–20 °С) и оттаивания (при комнатной температуре). Длительная стабильность аналитов в течение 30 дней при температуре –20 °С потенциально благоприятна для рутинного анализа при проведении исследований ТЛМ.

Значения определяемых концентраций находились в диапазоне: 1,6–85 нг/мл для венлафаксина; 5–143 нг/мл для О-десметилвенлафаксина. Данные, полученные в ТЛМ, были использованы для коррекции антидепрессивной терапии.

Таблица 4

Правильность и прецизионность метода определения венлафаксина, О-десметилвенлафаксина в плазме крови человека (*n* = 5)

Table 4

The accuracy and precision values of method detection for venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine in human plasma (*n* = 5)

Добавлено к плазме (нг/мл)	Измеренная концентрация	Правильность, %	Прецизионность, CV%	Измеренная концентрация	Правильность, %	Прецизионность, CV%
Венлафаксин, погрешность измерений						
12,5	14,1	12,8 %	10 %	11,1	–11,2 %	9,5 %
125	157	4,7 %	6,5 %	165	10,0 %	7,8 %
400	390	–2,5 %	8,1 %	417	4,25 %	5,3 %
О-десметилвенлафаксин, погрешность измерений						
12,5	11,7	–6,4 %	11	12,1	–3,2 %	9,2 %
125	148	–1,3 %	9,3	143	–4,7 %	9,4 %
400	421	5,25 %	11,2	425	6,25 %	7,7 %

Заключение / Conclusion

Предложен чувствительный и специфичный метод определения венлафаксина и его метаболита в плазме крови человека. Интерференции, вызванной эндогенными веществами плазмы, не выявлено. Метод достаточно быстрый (время хроматографической разгонки 5 минут), селективный и высокочувствительный с нижним пределом обнаружения не менее 1 нг/мл для всех изучаемых веществ. Метод пригоден для определения концентрации венлафаксина, и его метаболита (О-десметилвенлафаксина) при изучении клинической фармакокинетики и биоэквивалентности.

Данная методика была успешно апробирована на базе Научного центра психического здоровья («НЦПЗ» РАМН, Москва), для ТЛМ пациентов, получающих венлафаксин в связи с депрессивным состоянием.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Кузьмин Иван Игоревич
e-mail: rouswell9@gmail.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9326-4683
SPIN-код: 1442-0325
м. н. с. лаборатории доказательной медицины и биостатистика ФГБНУ НЦПЗ, Москва, Российская Федерация

Платова Ангелина Игоревна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: platova@psychiatry.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9682-4623
SPIN-код: 6656-2194
м. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ НЦПЗ, Москва, Российская Федерация

Константинова Анастасия Сергеевна
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5216-5294
Сервис-инженер ООО «ЛАБИНВЕСТ», Москва, Российская Федерация

Мирошниченко Игорь Иванович
e-mail: igormir@psychiatry.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4950-5336
SPIN-код: 4117-9703
д. м. н., заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ НЦПЗ, Москва, Российская Федерация

Kuzmin Ivan I.
e-mail: rouswell9@gmail.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9326-4683
SPIN code: 1442-0325
Research assistant of laboratory of evidence-based medicine and biostatistics, MHRC, Moscow, Russian Federation

Platova Angelina I.
Corresponding author
e-mail: platova@psychiatry.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9682-4623
SPIN code: 6656-2194
Research assistant of pharmacokinetics laboratory, MHRC, Moscow, Russian Federation

Konstantinova Anastasiya S.
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5216-5294
Service Engineer «LABINVEST» LLC, Moscow, Russian Federation

Miroshnichenko Igor I.
e-mail: igormir@psychiatry.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4950-5336
SPIN code: 4117-9703
Dr. Sci. (Med.), Head of pharmacokinetics laboratory MHRC, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Yuan Z, Chen Z, Xue M, Zhang J, Leng L. Application of antidepressants in depression: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Neurosci*. 2020;80:169–181. DOI: 10.1016/j.jocn.2020.08.013.

2. Sánchez-Mata MC, Cámara-Hurtado M, Díez-Marqués C, Torija-Isasa ME. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (Phaseolus vulgaris L.). *Eur Food Res Technol*. 2000;210(3):220–225. DOI: 10.1007/PL00005516

3. Shelton RC. Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors. *Handb Exp Pharmacol*. 2019;250:145–180. DOI: 10.1007/164_2018_164.

4. Hancu G, Lupu D, Milan A, Budău M, Barabás–Hajdu E. Enantioselective analysis of venlafaxine and its active metabolites: A review on the separation methodologies. *Biomedical Chromatograph*. 2021;35(1):e4874. DOI: 10.1002/bmc.4874.

5. Мирошниченко И. И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств // М.: Медицинское информационное агентство. М.: Мед. Информ; 2011, 416 с. [Miroshnichenko II. Racional'noe dozirovanie i monitoring lekarstvennyh sredstv. Moscow: Medical News Agency. 2011. (In Russ).].

6. Ganesh SV, Beunk L, Nikolik B, van der Weide J, Bet PM. Therapeutic drug monitoring of psychotropics as a diagnostic tool for CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Ther Drug Monit*. 2021;43(5):672–680. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000868.

7. Scherf-Clavel M, Weber H, Wurst C, Stonawski S, Hommers L, Unterecker S, Wolf C, Domschke K, Rost N, Brückl T, Lucae S, Uhr M, Binder EB, Menke A, Deckert J. Effects of Pharmacokinetic Gene Variation on Therapeutic Drug Levels and Antidepressant Treatment Response. *Pharmacopsychiatry*. 2022;55(05):246–254. DOI: 10.1055/a-1872-0613.

8. Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology. *Pharmacopsychiatry*. 2018 Jan;51(1-02):9–62. DOI: 10.1055/s-0043-116492.

9. Chenu F, Batten LA, Zernig G, et al. Comparison of pharmacokinetic profiles of brand-name and generic formulations of citalopram and venlafaxine: a crossover study. *J Clin Psychiatry*. 2009;70(7):958–966. DOI: 10.4088/jcp.09m05315.

10. Couchman L, Morgan PE, Spencer EP, et al. Plasma clozapine and norclozapine in patients prescribed different brands of clozapine (Clozaril, Denzapine, and Zaponex). *Ther Drug Monit*. 2010;32(5): 624–627. DOI: 10.1097/FTD.0b013e3181f0a1a2.

11. Сервие К.Ю., Апраксин В.Ф., Анисимова Н.А., Киреева А.В., Куклин В.Н. Определение препарата «Венлафаксин» в биологических жидкостях. *Фармация*. 2018;67(6):13–19. [Servie KYu, Apraksin VF, Anisimova NA, Kireeva AV, Kuklin VN. Determination of Venlafaxine in biological fluids. *Farmatsiya*. 2018;67(6):13–19. (In Russ).]. DOI: 10.29296/25419218-2018-06-03.

12. Truta L, Castro AL, Tarelho S, Costa P, Sales MGF, Teixeira HM. Antidepressants detection and quantification in whole blood samples by GC–MS/MS, for forensic purposes. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;128:496–503. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.06.027.

13. Sher M, Ahmad M, Hassan F, Naeem-ul-Hassan M, & Hussain MA. Development and validation of an HPLC-UV method for accelerated stability study and pharmacokinetic analysis of venlafaxine. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;56. DOI: 10.1590/s2175-97902019000217728.

14. Shen S, Zhang C, Mao Y. Determination of venlafaxine and its active metabolite O-desmethylvenlafaxine in human plasma by HPLC fluorescence. *Gen Psychiatr*. 2018;31(2):e000010. DOI: 10.1136/gpsych-2018-000010.

15. Bhatt J, Jangid A, Venkatesh G, Subbaiah G, & Singh S. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) method for simultaneous determination of venlafaxine and its active metabolite O-desmethyl venlafaxine in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;829(1-2):75–81. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.09.034.

16. Zhang Y, Cao H, & Jiang H. Supported liquid extraction versus liquid–liquid extraction for sample preparation in LC–MS/MS-based bioanalysis. *Bioanalysis*. 2013;5(3):285–288. DOI: 10.4155/bio.12.335.

17. Hansen MR, Kuhlmann IB, Pottegård A, Damkier P. Therapeutic Drug Monitoring of Venlafaxine in an Everyday Clinical Setting: Analysis of Age, Sex and Dose Concentration Relationships. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;121(4):298–302. DOI: 10.1111/bcpt.12796.

18. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int*. 2007;165(2-3):216–224. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.05.021.

Количественное определение моноаминовых нейротрансмиттеров в гомогенатах головного мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС

Попов Н. С.[1], Гавриленко Д. А.[1], Балабаньян В. Ю.[2], Петрова М. Б.[1], Донсков С. А.[1], Атаджанов И. Б.[1], Шатохина Н. А.[1]

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

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

Аннотация. *Актуальность*. Оценка влияния лекарственных средств на нейромедиаторные процессы является важной составляющей фармакодинамических исследований. Количественное определение моноаминовых нейротрансмиттеров в структурах головного мозга лабораторных животных является актуальной задачей фармакологии и физиологии. *Цель* — разработка методики количественного определения серотонина, дофамина, норэпинефрина, гистамина и эпинефрина в гомогенатах головного мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС. *Методы*. Выделение нейромедиаторов из мозга крыс осуществляли путём гомогенизации биоматериала с ацетонитрилом и хлористоводородной кислотой. Очистку извлечения проводили с помощью жидкость-жидкостной экстракции с хлороформом и изопропанолом. Детектирование моноаминов осуществляли с помощью масс-спектрометра AB Sciex QTrap 3200MD, хроматографирование проводили с использованием ВЭЖХ Agilent Technologies 1260 Infinity II. В качестве элюента использовали метанол и деионизированную воду. *Результаты*. Пробоподготовка представляла собой центрифугирование полученного гомогената, высушивание супернатанта в токе азота, растворение осадка в подвижной фазе, очистку раствора с помощью смеси хлороформа и изопропанола. Для хроматографического разделения моноаминовых нейромедиаторов использовали аналитическую колонку Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм. Общее время хроматографического анализа составило 12 минут, время удерживания норэпинефрина, эпинефрина, дофамина, серотонина, гистамина составило 2,8; 3,2; 5,4; 7,9; и 2,2 минут, соответственно. Аналитический диапазон методики составил 25,0–5000,0 нг/г для эпинефрина, гистамина и дофамина; 5,0–5000,0 нг/г для серотонина и 50,0–5000,0 для норэпинефрина. Для апробации методики был проведён анализ моноаминовых нейромедиаторов в стриатуме интактных крыс Wistar. *Заключение*. Разработанная биоаналитическая ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения моноаминовых нейромедиаторов в головном мозге крыс полностью соответствует валидационным требованиям. Метрологические характеристики методики позволяют с высокой точностью оценить содержание норэпинефрина, эпинефрина, дофамина, серотонина и гистамина в структурах головного мозга крыс.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС; хроматография; масс-спектрометрия; дофамин; норэпинефрин; эпинефрин; серотонин; гистамин

Для цитирования:
Попов Н. С., Гавриленко Д. А., Балабаньян В. Ю., Петрова М. Б., Донсков СА., Атаджанов И. Б., Шатохина Н. А. Количественное определение моноаминовых нейротрансмиттеров в гомогенатах головного мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(4):33–42. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-33-42
Поступила: 21 октября 2022 г. **Принята:** 17 ноября 2022 г. **Опубликована:** 24 декабря 2022 г.

Quantitative determination of monoamine neurotransmitters in rat brain homogenates using HPLC-MS/MS

Popov NS[1], Gavrilenko DA[1], Balabanyan VYu[2], Petrova MB[1], Donskov SA[1], Atadzhanov IB[1], Shatokhina NA[1]

[1] – FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

[2] – FSEI HPE Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Relevance.* Evaluation of the effect of drugs on neurotransmitter processes is an important component of pharmacodynamic studies. The quantitative determination of monoamine neurotransmitters in the brain structures of laboratory animals is an urgent task of pharmacology and physiology. Purpose of the study. Development of a method for the quantitative determination of serotonin, dopamine, norepinephrine, histamine and epinephrine in rat brain homogenates using HPLC-MS/MS. *Methods*. The isolation of neurotransmitters from the brain of rats was carried out by homogenizing the biomaterial with acetonitrile and hydrochloric acid. The extraction was purified by liquid-liquid extraction with chloroform and isopropanol. Monoamines were detected using an AB Sciex QTrap 3200MD mass spectrometer, chromatography was performed using an Agilent Technologies 1260 Infinity II HPLC. Methanol and deionized water were used as eluent. *Results*. Sample preparation consisted of centrifugation of the resulting homogenate, drying of the supernatant in a stream of nitrogen, dissolution of the precipitate in the mobile phase, and purification of the solution using a mixture of chloroform and isopropanol. An Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6×100 mm, 2.7 µm analytical column was used to separate monoamine neurotransmitters. The total time of the chromatographic analysis was 12 minutes, the retention time of norepinephrine, epinephrine, dopamine, serotonin, histamine was 2.8; 3.2; 5.4; 7.9; and 2.2 minutes, respectively. The analytical range of the technique was 25.0–5000.0 ng/g for epinephrine, histamine, and dopamine; 5.0–5000.0 ng/g for serotonin and 50.0–5000.0 for norepinephrine. To test the technique, we analyzed monoamine neurotransmitters in the striatum of intact Wistar rats. *Conclusion*. The developed bioanalytical HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of monoamine neurotransmitters in the rat brain fully complies with the validation requirements. The metrological characteristics of the technique make it possible to estimate the content of norepinephrine, epinephrine, dopamine, serotonin, and histamine in the brain structures of rats with high accuracy.

Keywords: HPLC-MS/MS; chromatography; mass spectrometry; dopamine; norepinephrine; epinephrine; serotonin; histamine

For citations:
Popov NS, Gavrilenko DA, Balabanyan VYu, Petrova MB, Donskov SA, Atadzhanov IB, Shatokhina NA. Quantitative determination of monoamine neurotransmitters in rat brain homogenates using HPLC-MS/MS. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2022;(4):33–42. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-33-42
Received: October 21, 2022. **Accepted:** November 17, 2022. **Published:** December 24, 2022

Введение / Introduction

Нейротрансмиттерами (НТ) называют биологически активные вещества, участвующие в синаптической передаче нервного импульса. Среди основных НТ выделяют ацетилхолин, аминокислоты (ГАМК, глицин, глутамат, аспарагинат) и моноамины (дофамин, норэпинефрин, эпинефрин, серотонин, гистамин) [1]. Нарушения обмена НТ могут приводить к широкому спектру неврологических и психических расстройств, фармакотерапия которых требует применения эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС). Оценка влияния ЛС на нейромедиаторные процессы является важной составляющей фармакодинамических исследований [2, 3]. Способность изменять содержание моноаминовых НТ в нервной ткани характерна для ЛС, обладающих противопаркинсонической, нейролептической, анальгетической, анксиолитической, снотворной активностью. Наличие нейропротекторных и прокогнитивных свойств у некоторых ЛС также связывают с их влиянием на нейромедиаторные процессы. Кроме того, важным элементом оценки безопасности новых фармакотерапевтических средств является анализ возможного аддиктивного потенциала. Известно, что формирование патологического пристрастия многих ЛС связано с их влиянием на систему «вознаграждения мозга», функционирование которой непосредственно связано с обменом дофамина [3, 4].

Таким образом, определение уровня моноаминовых НТ в структурах головного мозга лабораторных животных является актуальной задачей фармакологии и физиологии. Сочетание точных и воспроизводимых аналитических методик и биологических моделей является важным инструментом для изучения патогенеза различных заболеваний, а также фармакодинамики, эффективности и безопасности новых ЛС на этапе доклинических испытаний.

Определение моноаминовых НТ в биологических образцах является сложной задачей. Так, катехоламины обладают высокой чувствительностью к свету [5], тяжёлым металлам [6], высоким значениям pH [7] и могут легко подвергаться спонтанному окислению [8]. Кроме того, некоторые НТ существуют в свободной форме в очень низких концентрациях, что требует разработки и внедрения специфичных и чувствительных методик количественного определения. Среди методов количественного анализа веществ в биологических объектах ключевое место занимает высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией, использование которой в большинстве случаев упрощает процедуру пробоподготовки и позволяет с высокой чувствительностью и скоростью проводить количественное определение нескольких аналитов одновременно. На основании данных литературы об использовании ВЭЖХ-МС/МС для определения содержания моноаминовых НТ в головном мозге можно выделить основные недостатки предложенных методик: ограниченное число аналитов [9–11], длительное время анализа [12, 13] и сложная пробоподготовка, включающая дериватизацию или сублимационное высушивание [10, 14].

Цель исследования – разработка методики одновременного количественного определения серотонина, дофамина, норэпинефрина, гистамина и эпинефрина в гомогенатах головного мозга крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Материалы и методы / Materials and methods

Индивидуальные исходные растворы (stock solution, 1 мг/мл) моноаминовых НТ готовили на метаноле (J.T. Backer, Польша) путём растворения в мерных колбах объёмом 50 мл 50 мг субстанции каждого аналита в пересчёте на основание [15]. Использовали аналитические стандарты Sigma Aldrich: серотонина гидрохлорид (CAS: 153-98-0), норэпинефрина гидрохлорид (CAS: 55-27-6), эпинефрина гидрохлорид (CAS: 329-63-5), дофамина гидрохлорид (CAS: 62-31-7), гистамин (CAS: 51-45-6), в качестве внутреннего стандарта (IS) применяли сальбутамол (CAS: 18559-94-9). Отвешивание компонентов осуществляли на аналитических весах ВЛ-124В (Госметр, Россия), для ускорения растворения использовали орбитальный шейкер OS-20 (Biosan, Латвия). Для приготовления исходного комбинированного раствора НТ (100 мкг/мл) в мерную колбу объёмом 25 мл вносили по 2,5 мл каждого индивидуального раствора, после чего доводили объём до метки метанолом. Полученный комбинированный раствор использовали для приготовления серии рабочих растворов (work solution) на метаноле.

На этапе разработки методики пробоподготовки подбирали условия выделения моноаминовых НТ из биоматериала и последующей очистки полученного экстракта. Извлечение нейромедиаторов из тканей головного мозга крыс осуществляли путём гомогенизации с экстрагентом. С этой целью точную навеску биоматериала вносили в пробирку типа Эппендорф объёмом 1,5 мл, добавляли экстрагент из расчёта 400 мкл на 100 мг ткани, помещали бусину диаметром 4 мм из кварцевого стекла и гомогенизировали на вибрационной мельнице с частотой 50 Гц и амплитудой колебательных движений 30 мм в течение 10 минут. Полученный гомогенат центрифугировали при температуре 4 °C и частоте 15 000 об/мин в течение 15 минут с помощью лабораторной центрифуги SIGMA 1-14K (Финляндия). Супернатант переносили в отдельные пробирки Эппендорф и использовали для последующего анализа. Проводили сравнительный анализ использования в качестве экстрагента различных жидкостей: вода, метанол, ацетонитрил, водные растворы кислот (хлористоводородной, хлорной, муравьиной, трихлоруксусной, сульфосалициловой) различных концентраций, в том числе в комбинации. Кроме того,

оценивали влияние различных добавок к экстрагенту (натрия метабисульфит, ЭДТА, аскорбиновая кислота) на стабильность и степень извлечения аналитов. Так как ткани мозга содержат большое количество фосфолипидов, которые часто становятся причиной высоких значений матричного эффекта, на этапе разработки методики пробоподготовки подбирали условия очистки полученных извлечений от мешающих компонентов. Данную процедуру осуществляли с помощью жидкость-жидкостной экстракции, оценивали использование в качестве экстрагента различных растворителей (гексан, хлороформ, изопропанол). Для снижения нижнего предела количественного определения аналитов проводили концентрирование полученных экстрактов. С этой целью полученные экстракты моноаминовых НТ высушивали в токе азота с последующим растворением сухого остатка в малом количестве растворителя. Полученные готовые растворы после очистки переносили в полиэтиленовые вставки в хроматографические виалы из тёмного стекла и использовали для последующего анализа.

Хроматографическое разделение моноаминовых НТ осуществляли на обращённо-фазовой аналитической колонке InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм (Agilent Technologies, США) с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа 1260 Infinity II (Agilent Technologies, ФРГ), в качестве компонентов подвижной фазы использовали метанол и деионизированную воду с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты. В качестве детектора при проведении хроматографического анализа использовали тандемный квадрупольный масс-спектрометр AB Sciex QTrap 3200 MD (Sciex, Сингапур). Оптимизацию детектирования осуществляли с помощью шприцевого ввода в масс-спектрометр индивидуальных растворов (50,0 нг/мл) моноаминовых НТ и IS в метаноле с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты. Вначале для каждого аналита определяли m/z протонированных молекул при положительной ионизации, подбирали оптимальные значения потенциала декластеризации (DP) и напряжения на входе в ячейку соударений (CEP). Затем для установленных ионов-предшественников определяли масс-спектры второго порядка, выбирали 2 характеристических фрагментарных иона, для которых устанавливали наилучшие значения энергии соударений (CE) и напряжения на выходе из ячейки соударений (CXP). Полученные значения обеспечивали наилучшую селективность и чувствительность при регистрации моноаминовых НТ в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Для обработки первичных данных масс-спектрометрического и хроматографического анализа использовали программное обеспечение (ПО) Sciex Analyst 1.3.6, расчёт значений валидационных параметров проводили с использованием ПО Microsoft Office Excel 365.

В процессе валидации оценивали следующие параметры биоаналитической методики: селективность, матричный эффект, перенос пробы, линейность аналитического диапазона, нижний предел количественного определения (НПКО), внутри- и межсерийную точность и прецизионность, фактор разбавления. Кроме этого, определяли стабильность определяемых веществ на этапах анализа.

Результаты / Results

Для моноаминовых НТ и внутреннего стандарта были проанализированы масс-спектры первого и второго (рис. 1) порядка, результаты определения которых сравнивали с данными литературы [12, 18]. Для каждого вещества были определены два характеристических иона-продукта, для которых были подобраны параметры детектирования, обеспечивающие максимальную чувствительность (табл. 1).

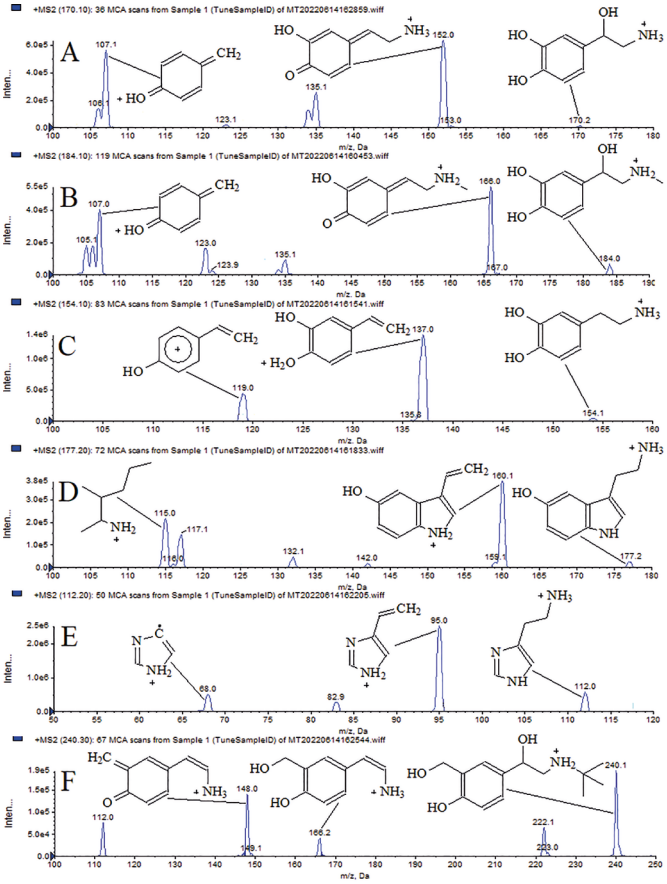


Рис. 1. Масс-спектры ионов-продуктов моноаминовых НТ (A – норэпинефрин, B – эпинефрин, C – дофамин, D – серотонин, E – гистамин) и внутреннего стандарта (F – сальбутамол) при положительной ионизации

Fig. 1. Mass spectra of monoamine HT product ions (A – norepinephrine, B – epinephrine, C – dopamine, D – serotonin, E – histamine) and internal standard (F – salbutamol) with positive ionization

Таблица 1

Параметры масс-спектрометрического детектирования моноаминовых НТ в режиме MRM

Table 1

Parameters of mass spectrometric detection of monoamine HT in MRM mode

Тип источника ионов				TurboIonSpray			
Режим ионизации				Положительный			
Температура источника ионов, °C				450,0			
Напряжение источника ионов, В				5500,0			
Давление газа завесы, psi				10,0			
Давление газа-распылителя, psi				40,0			
Давление газа-нагревателя, psi				50,0			
НТ	MRM, m/z	Dwell, мсек	DP, В	EP, В	CEP, В	CE, эВ	CXP, В
Норэпинефрин	170,2/152,0 170,2/107,1	100	34	10,0	9,5	13 23	2,3 2,5
Эпинефрин	184,2/166,0 184,2/107,0		30		9,7	15 23	2,9 3,7
Дофамин	154,2/137,0 154,2/119,0		29		7,0	11 20	2,7 4,0
Серотонин	177,2/160,1 177,2/115,0		27		9,6	14 14	2,5 3,9
Гистамин	112,0/95,0 112,0/68,0		49		14,0	15 16	3,0 2,5
Сальбутамол (IS)	240,1/148,0 240,1/166,2		51		13,0	24 21	2,5 2,8

Хроматографическое разделение моноаминовых НТ осуществляли в обращённо-фазовом режиме. В качестве компонента подвижной фазы, обладающего большей элюирующей силой, использовали метанол. Применение альтернативного элюента – ацетонитрила при любой программе градиента не приводило к полному разделению пиков норэпинефрина и мешающих компонентов матрицы. Таким образом, в качестве компонентов подвижной фазы использовали деионизированную воду (А) и метанол (В) с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты в градиентном режиме (табл. 2), общее время анализа составило 12 минут. По результатам анализа хроматограмм установлено, что время удерживания норэпинефрина, эпинефрина, дофамина, серотонина, гистамина составило 2,8; 3,2; 5,4; 7,9; и 2,2 минут, соответственно (рис. 2).

Таблица 2

Хроматографические параметры определения моноаминовых НТ

Table 2

Chromatographic parameters for the determination of monoamine HT

Колонка	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм			
Элюент А	Деионизированная вода + 0,1 % муравьиной кислоты			
Элюент В	Метанол + 0,1 % муравьиной кислоты			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% А	%В
	0,0 2,5 4,0 8,0 8,01 12,0	0,4	98 98 5 5 98 98	2 2 95 95 2 2
Температура колонки, °C	30			
Аликвота, мкл	5			
Общее время анализа, мин	12			
Промывка инжектора	3 секунды, 50 % водный раствор метанола			

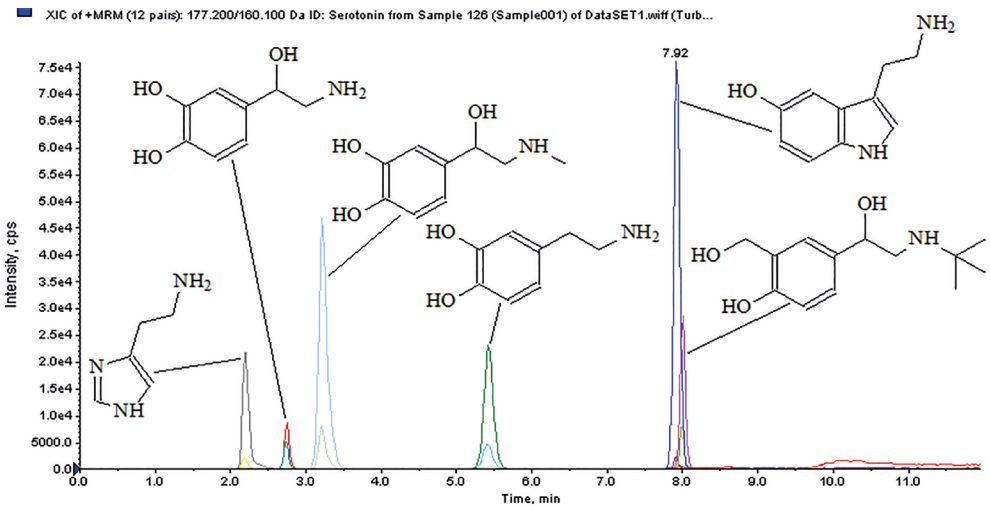


Рис. 2. Хроматограмма стандартного образца с индивидуальной концентрацией каждого моноаминового НТ в пересчёте на мозговую ткань 500 нг/г (подвижная фаза – метанол и деионизированная вода с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты; режим элюирования – градиентный; хроматографическая колонка – InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм; температура колонки – 30 °С; аликвота – 5 мкл)

Fig. 2. Chromatogram of a standard sample with an individual concentration of each monoamine HT in terms of brain tissue 500 ng/g (mobile phase – methanol and deionized water with the addition of 0.1% formic acid; elution mode – gradient; chromatographic column – InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 100 mm, 2.7 microns; temperature columns – 30 °C; aliquot – 5 µl)

Сравнительный анализ результатов пробоподготовки показал, что оптимальные значения степени извлечения и величины матричного эффекта для каждого аналита могут быть достигнуты при гомогенизации образцов мозговой ткани со смесью ацетонитрила и 0,1 н водного раствора хлористоводородной кислоты в соотношении 3:1. При этом происходит эффективное удаление белковых компонентов. Анализ использования ЭДТА с целью связывания тяжёлых металлов, способствующих ускоренному окислению катехоламинов [6], показал значительное снижение чувствительности определения гистамина и норэпинефрина. Добавление с этой же целью натрия метабисульфита или аскорбиновой кислоты привело к появлению на хроматограммах множества дополнительных мешающих пиков. Таким образом, методика пробоподготовки включала в себя гомогенизацию тканей головного мозга с извлекателем (ацетонитрил : 0,1н хлористоводородная кислота, 3:1) в соотношении 400 мкл на 100 мг биоматериала, последующее центрифугирование при температуре 4 °С и частоте 15000 об/мин в течение 15 минут. Затем 200 мкл супернатанта переносили в чистые пробирки типа Эппендорф объёмом 1,5 мл, добавляли 10 мкл метанольного раствора IS с концентрацией 100 нг/мл и высушивали в токе азота при температуре 40 °С с помощью испарительного концентратора NDK200-1N (Miulab, КНР), полученный сухой остаток растворяли в 50 мкл подвижной фазы (2 % водный раствор метанола + 0,1 % муравьиной кислоты). С целью очистки к полученному раствору добавляли 100 мкл смеси хлороформа и изопропанола (3:1) [16], перемешивали на центрифуге-вортексе FVL-2400N (Biosan, Латвия) в течение 1 минуты, после чего отделяли водный слой центрифугированием при комнатной температуре и частоте 3000 об/мин в течение 5 минут. Верхний слой переносили в полиэтиленовые вставки в виалы и использовали для хроматографического анализа.

Метрологические параметры методики определяли по результатам анализа серии стандартных образцов с содержанием каждого моноаминового НТ 5,0; 25,0; 50,0; 250,0; 500,0; 2500,0 и 5000,0 нг в пересчёте на 1 г мозговой ткани, а также контрольных и холостых образцов с добавлением внутреннего стандарта и без него. Так как в природе отсутствует свободная от моноаминовых НТ биологическая матрица, требуется доказательство возможности использования в качестве её заменителя чистого растворителя (100 мкл воды, 300 мкл ацетонитрила и 100 мкл 0,1 н раствора хлористоводородной кислоты). С этой целью был проведён эксперимент с добавлением рабочих метанольных растворов аналитов к аликвотам гомогената головного мозга крыс с последующим проведением процедуры пробоподготовки [17, 19]. Содержание моноаминовых НТ в образцах гомогената мозга крыс с добавками рассчитывали с использованием калибровочной зависимости, установленной по результатам анализа стандартных образцов на чистом растворителе. Разность между установленной концентрацией и концентраций стандартных растворов с добавкой определяли для каждого нейромедиатора.

Результаты экспериментов со стандартным добавлением показали, что для серотонина, гистамина, дофамина и эпинефрина на протяжении всего анали-

тического диапазона отклонения прироста концентраций не превышали 10 % от среднего значения, лишь для норэпинефрина эта величина была близка к 15 %. Кроме того, выявлено близкое к 1 значение отношения тангенсов угла наклона калибровочной прямой, построенной по результатам анализа гомогенатов мозга крыс с добавлением аналитов и стандартных растворов на чистом растворителе. Таким образом, установлено, что для построения калибровочной зависимости использование стандартных растворов моноаминовых НТ, приготовленных на чистом растворителе, не будет отражаться на правильности результатов анализа биологических образцов.

Для оценки селективности методики проводили сравнительный анализ отношения площадей хроматографических пиков двух характеристических ионов-продуктов каждого моноаминового НТ в чистом растворителе и с добавлением гомогената мозга. Было установлено, что для всех уровней концентраций каждого аналита этот показатель не превышал 10 %, что подтверждает селективность разработанной методики количественного определения.

По результатам хроматографического анализа серии стандартных образцов для всех моноаминовых НТ были построены калибровочные кривые, отражающие зависимость отношения площади пика аналита к площади пика IS от концентрации аналита в стандартном образце (рис. 3). Калибровочные зависимости были установлены в виде уравнений линейной регрессии, при этом считали приемлемыми значения коэффициента корреляции не ниже 0,99 (табл. 3).

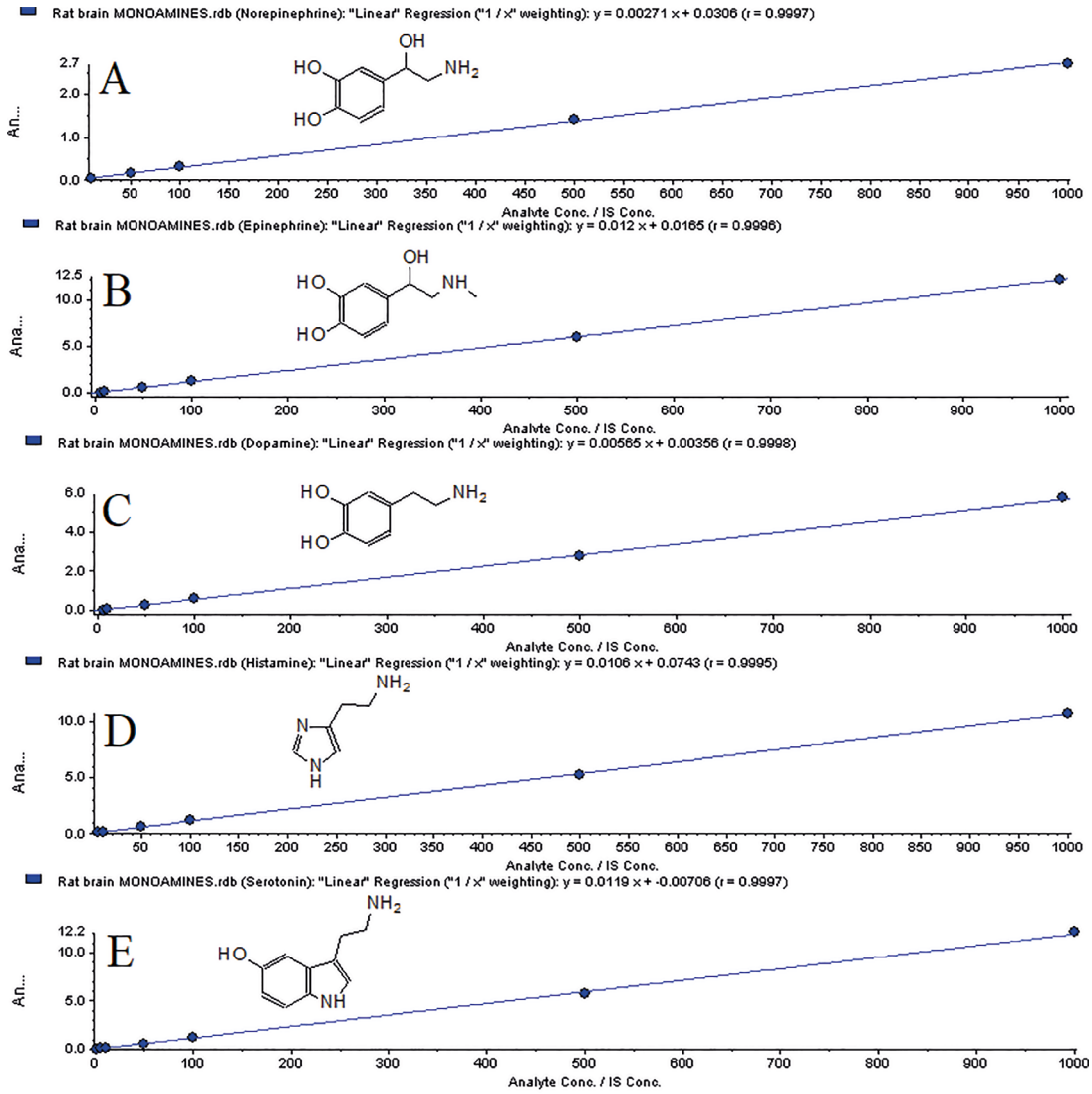


Рис. 3. Калибровочные прямые для количественного определения норэпинефрина (A), эпинефрина (B), дофамина (C), серотонина (D) и гистамина (E) (по горизонтальной оси представлена концентрация моноаминового НТ в гомогенате мозговой ткани (нг/мл), по вертикальной оси – отношение площади хроматографического пика НТ к площади пика IS – сальбутамола)

Fig. 3. Calibration lines for the quantitative determination of norepinephrine (A), epinephrine (B), dopamine (C), serotonin (D) and histamine (E) (the horizontal axis shows the concentration of monoamine HT in brain tissue homogenate (ng/ml), the vertical axis shows the ratio of the area of the chromatographic peak of HT to areas of the peak of IS – salbutamol)

Таблица 3

Валидационные характеристики методики определения моноаминовых нейротрансмиттеров в головном мозге крыс

Table 3

Validation characteristics of the method for determining monoamine neurotransmitters in the rat brain

Аналит	Норэпинефрин	Эпинефрин	Дофамин	Гистамин	Серотонин
Аналитический диапазон, нг/г	50,0 – 5000,0	25,0 – 5000,0	25,0 – 5000,0	25,0 – 5000,0	5,0 – 5000,0
НПКО, нг/г	50,0	25,0	25,0	25,0	5,0
Уравнение регрессии	y = 0,0027x + 0,0306	y = 0,012x + 0,0165	y = 0,00565x + 0,00356	y = 0,0106x + 0,0743	y = 0,0119x – 0,00706
r^2	0,9997	0,9996	0,9998	0,9995	0,9997
Межсерийная точность и прецизионность					
Нижний предел количественного определения					
Измеренная концентрация, нг/г, mean±SD	56,0±2,2	23,1±2,1	22,7±1,5	26,4±1,9	5,4±0,4
Точность, %	112,0	92,4	90,8	105,6	107,4
CV, %	4,34	8,35	6,00	7,66	7,74
Низкая концентрация					
Измеренная концентрация, нг/г, mean±SD	106,3±8,2	42,9±1,5	42,7±0,8	45,7±2,0	46,8±1,8
Точность, %	106,3	95,4	94,8	101,5	104,0
CV, %	8,18	3,24	1,77	4,41	4,09
Средняя концентрация					
Измеренная концентрация, нг/г, mean±SD	2287,5±27,2	2195,7±52,7	2172,2±63,4	2239,1±48,6	2242,1±59,3
Точность, %	101,7	97,6	96,5	99,5	99,6
CV, %	1,21	2,34	2,81	2,15	2,63
Высокая концентрация					
Измеренная концентрация, нг/г, mean±SD	4561,5±25,2	4470,2±59,7	4548,8±37,8	4508,9±20,1	4470,5±52,4
Точность, %	101,4	99,3	101,1	100,2	99,3
CV, %	0,56	1,32	0,84	0,45	1,16

В связи с отсутствием доступной холостой биологической матрицы нижний предел количественного определения (НПКО) моноаминовых НТ оценивали по результатам хроматографического анализа стандартов, приготовленных на чистом растворителе. За НПКО принимали условное содержание моноаминового НТ в 1 мг мозговой ткани, которая может быть определена со значениями относительного стандартного отклонения и относительной погрешности не более 20 %, при этом отношение «сигнал–шум» на хроматограмме должно быть не менее 10:1. Результаты определения НПКО представлены в табл. 3.

Перенос веществ во время хроматографического анализа оценивали путём сравнения хроматограмм холостых проб, анализируемых после шестикратного ввода пробы с высокой концентрацией каждого моноаминового НТ и проб с концентрацией аналитов на уровне НПКО. Было установлено, что отношение площадей хроматографических пиков всех моноаминовых НТ в холостых пробах к площади пиков в образцах НПКО был ниже максимально допустимого уровня (20 % для аналитов и 5 % для внутреннего стандарта), что свидетельствует о незначительном переносе веществ при переходе от большей концентрации к меньшей.

Точность и прецизионность методики оценивали в трёх сериях путём анализа 5 контрольных образцов для четырёх уровней концентраций: нижний предел количественного определения (НПКО), низкая концентрация (НК), средняя концентрация (СК), высокая концентрация (ВК). Точность была выражена в процентах, как отношение измеренной концентрации в контрольных образцах к номинальному содержанию аналита. Прецизионность определяли по коэффициенту вариации (CV) результатов пятикратного определения концентрации каждого аналита. Результаты межсерийной точности и прецизионности представлены в табл. 3.

Стабильность норэпинефрина, эпинефрина, дофамина, серотонина и гистамина в готовых гомогенатах тканей мозга крыс была подтверждена для высоких (900,0 нг/мл) и низких (45,0 нг/мл) концентраций. Оценивали стабильность аналитов после 3 циклов заморозки/разморозки, краткосрочную стабильность, стабильность стандартных растворов моноаминовых

Таблица 4

Содержание моноаминовых НТ в стриатуме интактных крыс Wistar

Table 4

The content of monoamine HT in the striatum of intact rats Wistar

Нейромедиатор	Норэпинефрин	Эпинефрин	Дофамин	Серотонин	Гистамин
Содержание, нг на 1 г ткани (M±S.E.M.)	312,8 ±39,7	Ниже НПКО	7971,6 ±893,1	456,6 ±24,9	312,8 ±35,0

НТ в метаноле, пост-препаративную стабильность и долгосрочную стабильность. По результатам анализа было установлено, что разница в площади пика каждого аналита во всех исследованных пробах и свежеприготовленных образцах не отличалась более чем на 15 %.

Так как содержание моноаминовых НТ в тканях головного мозга крыс может значительно превышать верхний предел количественного определения, была проведена оценка возможности десятикратного разбавления полученных гомогенатов смесью воды (1 часть), ацетонитрила (3 части), 0,1 н раствор хлористоводородной кислоты (1 часть). По результатам анализа было установлено, что разбавление образца не снижает точность и прецизионность количественного определения всех НТ.

Обсуждение / Discussion

Апробация разработанной методики была произведена путём анализа содержания моноаминовых НТ в стриатуме 5 интактных крыс Wistar, содержащихся в виварии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России. Результаты определения норэпинефрина, эпинефрина, дофамина, серотонина и гистамина сопоставимы с данными, полученными другими авторами [20–23] и представлены в таблице 4.

Ограничения исследования / Limitations of the study

По мнению авторов разработанная методика определения моноаминовых нейромедиаторов в гомогенатах тканей мозга крыс имеет ряд особенностей, ограничивающих её использование. К ним можно отнести отсутствие широкого распространения тандемных масс-спектрометров, используемых в качестве детектора для ВЭЖХ, а также невозможность оценивать изменение уровня определяемых метаболитов в динамике у одних и тех же лабораторных животных.

Заключение / Conclusion

Разработанная биоаналитическая ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения моноаминовых нейромедиаторов в головном мозге крыс полностью соответствует валидационным требованиям. Метрологические характеристики методики позволяют с высокой точностью оценить содержание норэпинефрина, эпинефрина, дофамина, серотонина и гистамина в структурах мозга крыс, что несомненно является актуальным и востребованным в исследовании патологических процессов и механизма действия фармакологических средств.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ/ ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. У авторов отсутствует какой-либо конфликт интересов.

Conflict of interest. The authors do not have any conflict of interest.

Участие авторов. *Попов Н. С.*, *Гавриленко Д. А.* – осуществляли разработку и валидацию биоаналитической методики; *Балабаньян В. Ю.* – отвечал за организационную часть исследования; *Петрова М. Б.*, *Донсков С. А.*, *Атаджанов И. Б.* – осуществляли забор биологического материала и выделение структур головного мозга крыс; *Шатохина Н. А.* – выполняла статистическую обработку полученных результатов; все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов.

Participation of authors. *Popov NS*, *Gavrilenko DA* – carried out the development and validation of the bioanalytical methodology; *Balabanyan VYu* – was responsible for the organizational part of the study; *Petrova MB*, *Donskov SA*, *Atajanov IB* – carried out the collection of biological material and isolation of rat brain structures; *Shatokhina NA* – performed statistical processing of the results; all the authors participated in the discussion of the results obtained.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Попов Никита Сергеевич
Автор, ответственный за переписку
e-mail: ns.popov@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1792-7414
SPIN-код: 1974-7300
к. фарм. н., зав. научно-исследовательской лабораторией, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Popov Nikita S.
Corresponding author
e-mail: ns.popov@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1792-7414
SPIN code: 1974-7300
PhD, Cand. Pharm Sci., Head of Research Laboratory, Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Гавриленко Дмитрий Антонович
e-mail: niruef@yandex.ru
SPIN-код: 5573-2662
асс. кафедры химии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Gavrilenko Dmitry A.
e-mail: niruef@yandex.ru
SPIN code: 5573-2662
Assistant of the Department of Chemistry, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Балабаньян Вадим Юрьевич
e-mail: bal.pharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-5744-7060
SPIN-код: 7351-7328
д. фарм. н., доцент, в. н. с., лаборатория трансляционной медицины, факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Balabanyan Vadim Yu.
e-mail: bal.pharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-5744-7060
SPIN code: 7351-7328
Dr. Sci. (Pharm), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Translational Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov MSU, Moscow, Russian Federation

Петрова Маргарита Борисовна
e-mail: education@tvgmu.ru
SPIN-код: 4310-3839
д. б. н., профессор, зав. кафедрой биологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Petrova Margarita B.
e-mail: education@tvgmu.ru
SPIN code: 4310-3839
Dr. Sc. (Biol.), Professor, Head of Department of Biology, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Донсков Сергей Александрович
e-mail: donskov_s@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-3780-5534
SPIN-код: 1026-7460
к. с.-х. н., доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Donskov Sergey A.
e-mail: donskov_s@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-3780-5534
SPIN code: 1026-7460
PhD, Cand. Agricult Sci., Associate Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Атаджанов Ильяс Борисович
e-mail: atadzanov.ilyas@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-1995-2661
препаратор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Atadzhanov Ilyas B.
e-mail: atadzanov.ilyas@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-1995-2661
preparator of the Department of Histology, Embryology and Cytology, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Шатохина Наталья Александровна
e-mail: chatokhina@mail.ru
SPIN-код: 8171-5540
к. м. н., доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерацияя

Shatokhina Natalya A.
e-mail: chatokhina@mail.ru
SPIN code: 8171-5540
PhD, Cand. Med Sci., Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

Список литературы / References

1. Barandouzi ZA, Lee J, del Carmen Rosas M, et al. Associations of neurotransmitters and the gut microbiome with emotional distress in mixed type of irritable bowel syndrome. Sci Rep. 2022;12(1):1648. DOI: 10.1038/s41598-022-05756-0.

2. Федеральный закон Российской Федерации № 61 от 12 апреля 2010 г. «Об обращении лекарственных средств». [Federal Law of Russian Federation №61 of 12 April 2010 «Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv». (In Russ).]. URL: https://base.garant.ru/12174909/ Ссылка активна на: 17.10.2022

3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 17–24 с. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv Part 1. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ).].

4. Fei YY, Johnson PA, Omran NAL, et al. Maladaptive or misunderstood? Dopamine fasting as a potential intervention for behavioral addiction. *Lifestyle Med.* 2021;3(1):e54. DOI: 10.1002/lim2.54.

5. Jung-Klawitter S, Kuseyri Hübschmann O. Analysis of catecholamines and Pterins in inborn errors of monoamine neurotransmitter metabolism—from past to future. *Cells.* 2019;8(8):867. DOI: 10.3390/cells8080867.

6. Kontur PJ, Fechter LD. Brain regional manganese levels and monoamine metabolism in manganese-treated neonatal rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1988;10(4):295–303. DOI: 10.1016/0892-0362(88)90031-1

7. Seyfried CA, Adam G, Greve T. An automated direct-injection HPLC-method for the electrochemical/fluorimetric quantitation of monoamines and related compounds optimized for the screening of large numbers of animals. *Biomed Chromatogr.* 1986;1(2):78–88. DOI: 10.1002/bmc.1130010206.

8. Wang W, Wu X, Yang CS, et al. An unrecognized fundamental relationship between neurotransmitters: Glutamate protects against catecholamine oxidation. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(10):1564. DOI: 10.3390/antiox10101564.

9. Cannazza G, Carrozzo MM, Cazzato AS, et al. Simultaneous measurement of adenosine, dopamine, acetylcholine and 5-hydroxytryptamine in cerebral mice microdialysis samples by LC–ESI-MS/MS. *J Pharm Biome Anal.* 2012;71:183–186. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.08.004.

10. Greco S, Danysz W, Zivkovic A, et al. Microdialysate analysis of monoamine neurotransmitters—a versatile and sensitive LC–MS/MS method. *Anal Chim Acta.* 2013;771:65–72. DOI: 10.1016/j.aca.2013.02.004.

11. Uutela P, Reinilä R, Piepponen P, et al. Analysis of acetylcholine and choline in microdialysis samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19(20):2950–2956. DOI: 10.1002/rcm.2160.

12. Xu N, Qiu C, Wang W, et al. HPLC/MS/MS for quantification of two types of neurotransmitters in rat brain and application: Myocardial ischemia and protection of Sheng-Mai-san. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(1):101–108. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.12.015.

13. Kovac A, Somikova Z, Zilka N, et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of panel of neurotransmitters in cerebrospinal fluid from the rat model for tauopathy. *Talanta.* 2014;119:284–290. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.10.027.

14. Syslová K, Rambousek L, Kuzma M, et al. Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: Method combining freeze-drying with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2011;1218(21):3382–3391. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.02.006.

15. Chen D, Zhang J-X, Cui W-Q, et al. A simultaneous extraction/derivatization strategy coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of free catecholamines in biological fluids. *J Chromatogr A.* 2021;1654:462474. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462474.

16. Thomas J, Khanam R, Vohora D. A validated HPLC-UV method and optimization of sample preparation technique for norepinephrine and serotonin in mouse brain. *Pharm Biol.* 2015;53(10):1539–1544. DOI: 10.3109/13880209.2014.991837.

17. Ma S-R, Yu J-B, Fu J, et al. Determination and application of nineteen monoamines in the gut microbiota targeting phenylalanine, tryptophan, and glutamic acid metabolic pathways. *Molecules.* 2021;26(5):1377. DOI: 10.3390/molecules26051377.

18. Xie Z, Lorkiewicz P, Riggs DW, et al. Comprehensive, robust, and sensitive UPLC-MS/MS analysis of free biogenic monoamines and their metabolites in urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018;1099:83–91. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.09.012.

19. Minkler P, Stoll M, Ingalls S et al. Quantification of Carnitine and Acylcarnitines in Biological Matrices by HPLC Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 2008;54(9):1451–1462. DOI:10.1373/clinchem.2007.099226.

20. González-Pardo H, Arias J, Gómez-Lázaro E, et al. Sex-Specific Effects of Early Life Stress on Brain Mitochondrial Function, Monoamine Levels and Neuroinflammation. *Brain Sci.* 2020;10(7):447. DOI: 10.3390/brainsci10070447.

21. Doroshenko Y, Lelevich V. Biogenic Monoamines, Their Precursors, and Metabolites in the Brain of Rats under Experimental Circulatory Failure. *Neurochemical Journal.* 2020;14(3):295–302. DOI: 10.1134/S1819712420030034.

22. Mahmood D, Akhtar M, Jahan K, et al. Histamine H3 receptor antagonists display antischizophrenic activities in rats treated with MK-801. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2016;27(5):463–471. DOI: 10.1515/jbcpp-2015-0045.

23. Krupina N, Khlebnikova N, Narkevich V, et al. The Levels of Monoamines and Their Metabolites in the Brain Structures of Rats Subjected to Two- and Three-Month-Long Social Isolation. *Bull Exp Biol Med.* 2020;168(5):605–609. DOI: 10.1007/s10517-020-04761-5.

Проявление патогномоничных признаков при моделировании сахарного диабета стрептозотоцином у мышей BALB/c

Сорокина А. В., Жанатаев А. К., Чайка З. В., Мирошкина И. А., Лисицын А. А., Дурнев А. Д.

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

Аннотация. *Актуальность*. Сахарный диабет является широко распространённым, социально-значимым заболеванием. В связи с этим важно получить экспериментальную модель, предваряющую последующие эксперименты по фармакологическому скринингу и/или изучению механизма действия антидиабетических средств. *Целью* настоящей работы явилась сравнительная оценка проявления гипергликемии, повреждений ДНК и морфологии внутренних органов у мышей BALB/c при моделировании сахарного диабета однократным введением стрептозотоцина в дозе 200 мг/кг и его дробным, пятидневным введением из расчёта 40 мг/кг в сутки. *Методы*. В качестве индуктора диабета применяли стрептозотоцин. Препарат вводили мышам однократно в дозе 200 мг/кг или 5-кратно ежедневно в дозе 40 мг/кг. Осуществляли контроль гипергликемии, повреждённости ДНК в клетках мозга, печени, почек, поджелудочной железы и семенников, а также оценивали микроскопическую картину отдельных внутренних органов, включая поджелудочную железу. *Результаты*. В обоих вариантах эксперимента прослеживается воспроизведение патогномонических признаков сахарного диабета. Несколько более отчётливо они прослеживаются в варианте эксперимента с дробным, пятидневном введением стрептозотоцина в разовых дозах 40 мг/кг.

Ключевые слова: сахарный диабет; стрептозотоцин; гипергликемия; мыши

Для цитирования:
Сорокина А. В., Жанатаев А. К., Чайка З. В., Мирошкина И. А., Лисицын А. А., Дурнев А. Д. Проявление патогномоничных признаков при моделировании сахарного диабета стрептозотоцином у мышей BALB/c. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(4):43–49. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-43-49
Поступила: 21 октября 2022 г. **Принята:** 01 ноября 2022 г. **Опубликована:** 24 декабря 2022 г.

Manifestation of pathognomonic signs in modeling diabetes mellitus with streptozotocin in BALB/c mice

Sorokina AV, Zhanataev AK, Chayka ZV, Miroshkina IA, Lisitsyn AA, Durnev AD
FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. *Relevance*. Diabetes mellitus is a widespread, socially significant disease. In this regard, it is important to obtain an experimental model that precedes subsequent experiments on pharmacological screening and/or study of the mechanism of action of antidiabetic agents. *The aim* of this work was a comparative assessment of the manifestation of hyperglycemia, DNA damage, and morphology of internal organs in BALB/c mice in the modeling of diabetes mellitus by a single administration of streptozotocin at a dose of 200 mg/kg and its fractional, five-day administration at a rate of 40 mg/kg per day. *Methods*. Streptozotocin was used as an inducer of diabetes. The drug was administered to mice once at a dose of 200 mg/kg or 5 times daily at a dose of 40 mg/kg. We monitored hyperglycemia, DNA damage in the cells of the brain, liver, kidneys, pancreas and testes, and also assessed the microscopic picture of individual internal organs, including the pancreas. *Results*. In both variants of the experiment, the reproduction of pathognomonic signs of diabetes mellitus is traced. They are somewhat more clearly seen in the variant of the experiment with a fractional, five-day administration of streptozotocin in single doses of 40 mg/kg.

Keywords: diabetes mellitus; streptozotocin; hyperglycemia; mice

For citations:
Sorokina AV, Zhanataev AK, Chayka ZV, Miroshkina IA, Lisitsyn AA, Durnev AD. Manifestation of pathognomonic signs in modeling diabetes mellitus with streptozotocin in BALB/c mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(4):43–49. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-43-49
Received: October 21, 2022. **Accepted:** November 01, 2022. **Published:** December 24, 2022.

Введение / Introduction

Сахарный диабет является широко распространённым, социально-значимым заболеванием. Масштабы распространения сахарного диабета, особенно сахарного диабета второго типа, увеличиваются год от года [1–3].

На этом фоне неизменный интерес вызывает экспериментальное моделирование сахарного диабета у лабораторных животных для исследования патогенеза заболевания и доклинического изыскания перспективных лекарств. Сегодня известно около двух десятков способов индукции сахарного диабета в эксперименте [4–6]. Особую популярность имеет применение стрептозотоцина, алкилирующего агента, являющегося производным нитрозомочевины и вызывающего необратимое повреждение β-клеток поджелудочной железы [4, 6]. В этой связи, стрептозотоциновой диабет преимущественно рассматривают как модель диабета первого типа. Ряд авторов считает, что в зависимости от использованной дозы и режима введения стрептозотоцином можно смоделировать сахарный диабет второго типа или какой-то промежуточный вариант, сочетающий признаки сахарного диабета первого и второго типа [4, 5]. При этом в каждом конкретном случае не исключена зависимость проявления диабетогенного действия от избранной линии и/или вида животных, их пола, возраста, условий содержания и других привходящих факторов.

Подобное положение ставит исследователя перед необходимостью экспериментальной характеристики

модели, предваряющей последующие эксперименты по фармакологическому скринингу и/или изучению механизма действия антидиабетических средств.

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка проявления гипергликемии, повреждений ДНК и морфологии внутренних органов у мышей BALB/c при моделировании сахарного диабета однократным введением стрептозотоцина в дозе 200 мг/кг и его дробным, пятидневным введением из расчёта 40 мг/кг в сутки.

Материалы и методы / Materials and methods

Исследование проведено на самцах мышей BALB/c массой 20–22 г в возрасте 8–9 недель, полученных из сертифицированного питомника Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при 12-часовом световом режиме в соответствии с общепринятыми стандартами (ГОСТ 33044-2014) на стандартном полнорационном гранулировано-экструдированном комбикорме для грызунов «Профгрызун» (Россия) при свободном доступе к воде. Животные линии BALB/c наиболее часто используются при экспериментальном моделировании диабета у мышей [6, 7].

В качестве индуктора диабета применяли стрептозотоцин (Sigma-Aldrich, США, кат. #S0130-100MG). Препарат вводили мышам внутрибрюшинно в 50 мМ цитратном буфере (pH 4,5) в двух режимах – однократно в дозе 200 мг/кг или 5-кратно ежедневно в дозе 40 мг/кг, согласно существующим протоколам [7]. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили буферный раствор. Объём введения во всех случаях составлял 0,2–0,25 мл.

Перед каждым введением стрептозотоцина за 4 часа до инъекции удаляли корм из клеток. После введения стрептозотоцина питьевую воду заменяли на 10 % раствор сахарозы и возвращали корм. При однократном введении эвтаназию животных осуществляли смещением шейных позвонков на 10- и 21-й день после введения стрептозотоцина, при многодневном введении – на 14- и 28-й дни после заключительного введения диабетогенного агента. Сроки наблюдений выбирали, исходя из соответствующих рекомендаций [7].

Каждая экспериментальная и контрольная группы включала по 9 животных.

Контроль гипергликемии осуществляли при помощи сертифицированного глюкометра Акку-Чек Актив (Roche) в крови, отобранной из сердца после эвтаназии животных.

Регистрацию повреждённости ДНК проводили методом «ДНК-комет» в щелочной версии в соответствии с рекомендациями [8]. Непосредственно перед микроскопированием препараты окрашивали красителем SYBR Green I (1:10000 в ТЕ-буфере (pH 8.5) в 50 % глицерине) в течение 30 минут. Изображения с микропрепаратов получали на эпифлуо-ресцентном микроскопе Микмед-2 12Т (Ломо, Россия), совмещённом с цифровой камерой высокого разрешения (VEC-335, ЭВС, Россия), при увеличении ×200. Изображения ДНК-комет анализировали с использованием программного обеспечения CASP 1.2.2. В качестве показателя повреждённости ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет («% ДНК в хвосте»). С каждого микропрепарата анализировали не менее 100 ДНК-комет. В отдельную группу выделяли атипичные ДНК-кометы с практически отсутствующей головой и широким диффузным хвостом, являющихся косвенным свидетельством цитотоксичности [9]. Уровень атипичных ДНК-комет подсчитывали в % на 500 ДНК-комет.

Для оценки статистической значимости различий между контрольными и экспериментальными группами для показателя «% ДНК в хвосте» использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни, для показателя % атипичных ДНК-комет – критерий $\chi 2$ [10].

Всех животных подвергали патологоанатомическому вскрытию. При этом помимо обзорного описания макроскопической картины всех внутренних органов, оценивали состояние поджелудочной железы, печени и почек, отобранные фрагменты которых фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина (Биовитрум).

По окончании срока фиксации из отобранных органов вырезали небольшие участки, помещали их в заливочные кассеты, затем осуществляли гистологическую проводку по стандартному протоколу с помощью Автоматического тканевого процессора карусельного типа (Leica TP 1020, Leica Microsystems, ФРГ).

По завершении проводки обезвоженные фрагменты ткани исследуемых органов заливали в гомогенизированную парафиноподобную среду Paraplast (Leica Biosystems Richmond, США), используя при этом модульную Систему с графическим дисплеем (Tissue-Tek® TEK, Sakura, Япония).

Гистологические срезы толщиной 5–6 микрон получали с помощью специально оборудованного рабочего места для микротомии (Bio-Optica Milano SPA, Италия) и ротационного микротома (Accu-CutSRM 200, Sakura, Япония). Предметные стекла с помещёнными на них срезами просушивали.

В дальнейшем депарафинированные и окрашенные по стандартному протоколу галлоцианин эозином гистологические срезы помещали под покровные стекла, используя синтетическую монтирующую среду Bio Mount (Bio-Optica Milano SPA, Италия).

Кроме того, по окончании фиксации и промывки водопроводной водой с помощью замораживающего микротома микротомировали фрагменты печени. Полученные срезы толщиной 20 микрон окрашивали масляным красным по Лилли. Срезы помещали под покровные стекла, используя в качестве монтирующей среды глицерин.

Готовые микропрепараты исследовали в проходящем свете с помощью микроскопа Nikon Eclipse 55 I (Япония) при увеличении 40, 100, 200 и 400. Документировали изображения фотокамерой Nikon DS-Fi1cc применением программы визуализации изображений NIS Elements BR для Nikon.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

В крови животных контрольной серии эксперимента содержание глюкозы составило 8,5 ± 1,1 ммоль/л.

На 10-й день после однократного введения стрептозотоцина было отмечено значимое ($p < 0{,}01$) увеличение концентрации глюкозы в крови до 21,9 ± 5,8 ммоль/л, на 21-й день этот показатель составил 29,1 ± 6,5 ммоль/л.

После пятикратного введения стрептозотоцина уровень глюкозы на 14-й день эксперимента составил 19,8 ± 4,0 ммоль/л и на 28-й день – 16,8 ± 5,5 ммоль/л, что значимо выше ($p < 0{,}01$), чем в контроле.

Таким образом, в обоих вариантах эксперимента была установлена отчётливая гипергликемия, выраженная в большей степени при однократном введении стрептозотоцина. Наличие гипергликемии свидетельствует о развитии диабета у экспериментальных животных. При этом потребление воды животными увеличилось до 5–7 мл/мышь в сутки, а масса животных практически не изменялась на всём протяжении эксперимента.

Оценка повреждённости ДНК была проведена в клетках пяти органов, полученные результаты представлены на рис. 1

На 10-й день после однократного введения стрептозотоцина выявлено значимое увеличение повреждённости ДНК в клетках печени и почек животных (рис. 1, а). На 21-й день после введения диабетогенного агента значимое увеличение повреждённости ДНК выявлено только в клетках печени (рис. 1, б). Ни при одном сроке наблюдений не выявлено повреждённо-

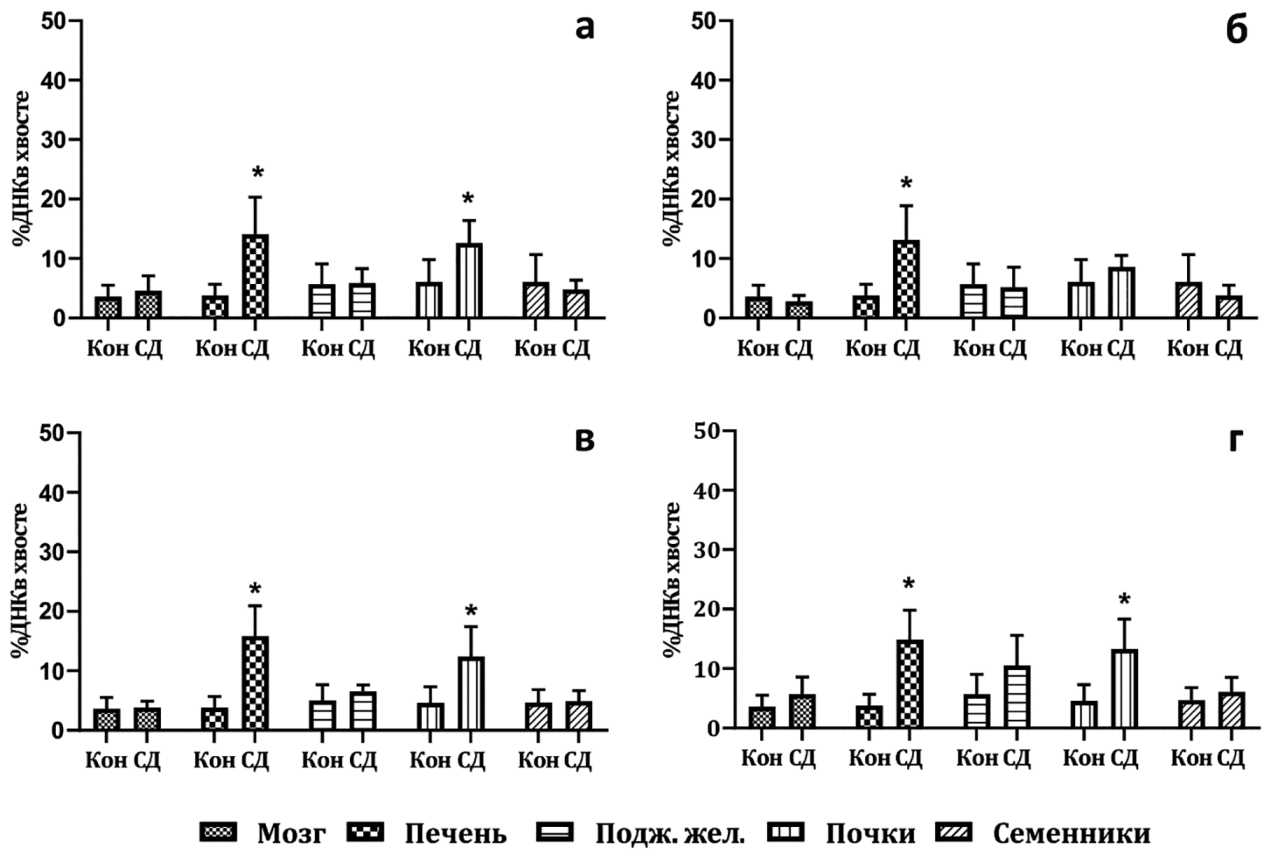


Рис. 1. Уровень повреждений ДНК в органах мышей на 10-й день (а) и на 21-й день (б) после введения стрептозотоцина в дозе 200 мг/кг; на 14-й (в) и 28-й день (г) после пятидневного введения стрептозотоцина в дозе 40 мг/кг
Примечания: * – $p < 0{,}01$ по сравнению с группой контроля «Кон» (U-критерий Манна – Уитни); «СД» – группа животных с диабетом, индуцированным введением стрептозотоцина.

Fig. 1. The level of DNA damage in the organs of mice on day 10 (a) and day 21 (б) after administration of 200 mg/kg streptozocin; on days 14 (в) and 28 days (г) after a 5 days of daily administration of 40 mg/kg streptozotocin
Notes: * – $p < 0.01$ compared with the control group "Кон" (Mann-Whitney U-test); "СД" – a group of animals with diabetes induced by streptozotocin.

сти ДНК в клетках головного мозга, поджелудочной железы и семенников.

При многократном введении стрептозотоцина значимое увеличение повреждённости ДНК также выявлено только в клетках печени и почек как на 14-й (рис. 1, в), так и на 28-й дни (рис. 1, г) наблюдений.

Обращает внимание, что в количественном отношении повреждённость ДНК практически не различалась в печени и почках при однократном и многократном введении стрептозотоцина при ранних сроках наблюдения и была практически одинаковой при поздних сроках в клетках печени. В противоположность, увеличение повреждённости ДНК в клетках почек регистрировалось на позднем сроке только в варианте эксперимента, предусматривающем многократное введение стрептозотоцина.

После однократного введения стрептозотоцина на 21-й день эксперимента выявлено значимое повышение уровней атипичных комет в клетках печени до 11,5 ± 4,7 % против 2,0 ± 0,5 % в контроле. В почках увеличение процента атипичных комет выявлено и на 10-й (16,1 ± 8,2 %), и на 21-й день (9,4 ± 1,7 %) наблюдения при показателе 2,6 ± 2,0 % у животных контрольной группы.

После многократного введения стрептозотоцина значимое повышение уровней атипичных ДНК-комет в печени и почках было выявлено на обоих сроках наблюдения. В печени уровень атипичных комет составил 44,3 ± 19,0 и 5,3 ± 2,8 %, соответственно, на 14-й и 28-й день при контрольном значении 2,0 ± 0,5 %. В почках при контрольном значении 2,6 ± 2,0 % соответствующий показатель составил 25,9 ± 7,4 % на 14 день, и 7,7 ± 2,0 % – на 28-й день эксперимента.

Таким образом, при двух использованных способах моделирования стрептозотоцин-индуцированный диабет у мышей сопровождается увеличением повреждённости ДНК в клетках печени и почек, но не головного мозга и семенников. Для клеток поджелудочной железы выявлена тенденция к увеличению повреждённости ДНК при многократном введении стрептозотоцина. Повреждённость ДНК в печени и почках наиболее выражена на 10-й день при однократном и на 14-й день – при многократном введении стрептозотоцина. Аналогичная картина характерна для содержания атипичных ДНК-комет. Эти результаты, в целом свидетельствуют о некотором преимуществе многократного введения стрептозотоцина с точки зрения моделирования такого патогномичного признака диабета, как повреждённость ДНК.

При микроскопическом исследовании поджелудочной железы, печени и почек мышей, получавших стрептозотоцин пятикратно в разовых дозах по 40 мг/кг, отмечены морфологические признаки микроангиопатии в поджелудочной железе и почках (рис. 2, б и г). В поджелудочной железе обнаружен липоматоз, атрофия островков Лангернанса, а также деструкция инсулоцитов (рис. 2, г). В печени наблюдаются морфологические признаки жировой дистрофии.

В то же время микроскопические исследования поджелудочной железы, печени и почек мышей, получавших стрептозотоцин однократно в дозе 200 мг/кг, позволили выявить сходные изменения. Выраженность одних признаков, таких как атрофия островков Лангернанса с деструкцией инсулоцитов, была сравнима с таковыми, наблюдаемыми у мышей, которым стрептозотоцин вводили дробно. Другие же изменения – начальной липоматоз и ускоренная секреция в экзокринной части поджелудочной железы, жировая дистрофия печени, а также мелкокапельная вакуольная дистрофия эпителия почечных канальцев, были обнаружены у части мышей данной группы.

Таким образом, в изученных внутренних органах при сохранённой архитектонике у подавляющего большинства экспериментальных мышей выявлены характерные изменения их микроскопической картины. В обоих вариантах эксперимента воспроизводится главный морфологический признак сахарного диабета – поражение островков Лангернанса поджелудочной железы. В остальном обнаруженные у подавляющего большинства характерные для сахарного диабета изменения микроскопической картины более отчётливо выражены в условиях повторного пятидневного введения стрептозотоцина.

Сравнение результатов двух проведённых экспериментов демонстрирует большую выраженность гипергликемии при однократном введении стрептозотоцина в дозе 200 мг/кг по сравнению с дробным введением диабетагена в той же суммарной дозе; 21,9–29,1 ммоль/л против 16,8–19,8 ммоль/л. При этом после однократного введения на более поздних сроках наблюдения отмечалось нарастание содержания глюкозы, тогда как при дробном введении – падение её содержания.

Уровни повреждённости ДНК в обоих вариантах эксперимента были количественно сходны в клетках печени при обоих сроках наблюдения, тогда как в клетках почек количественно сходный генотоксический эффект выявлялся только на первом сроке наблюдения. На втором сроке, более отставленном от начала эксперимента, повреждённость ДНК наблюдалась после дробного введения стрептозотоцина и отсутствовала при его однократном введении.

Этот результат не согласуется с результатами, характеризующими гипергликемию. Теоретически, исходя из представлений о гипергликемии как триггере окислительного стресса, продуцирующего активные формы кислорода [4, 11], с её нарастанием должен нарастать генотоксический эффект. Фактически это не так. Более того, в ранее проведённой работе [12] было показано, что на меньших уровнях гипергликемии повреждённость ДНК наблюдается не только в клетках печени и почек мышей BALB/c, но также поджелудочной железе, т. е. более выражена. Отсутствие подобного эффекта в наших экспериментах логично объяснить элиминацией клеток с повреждённой ДНК

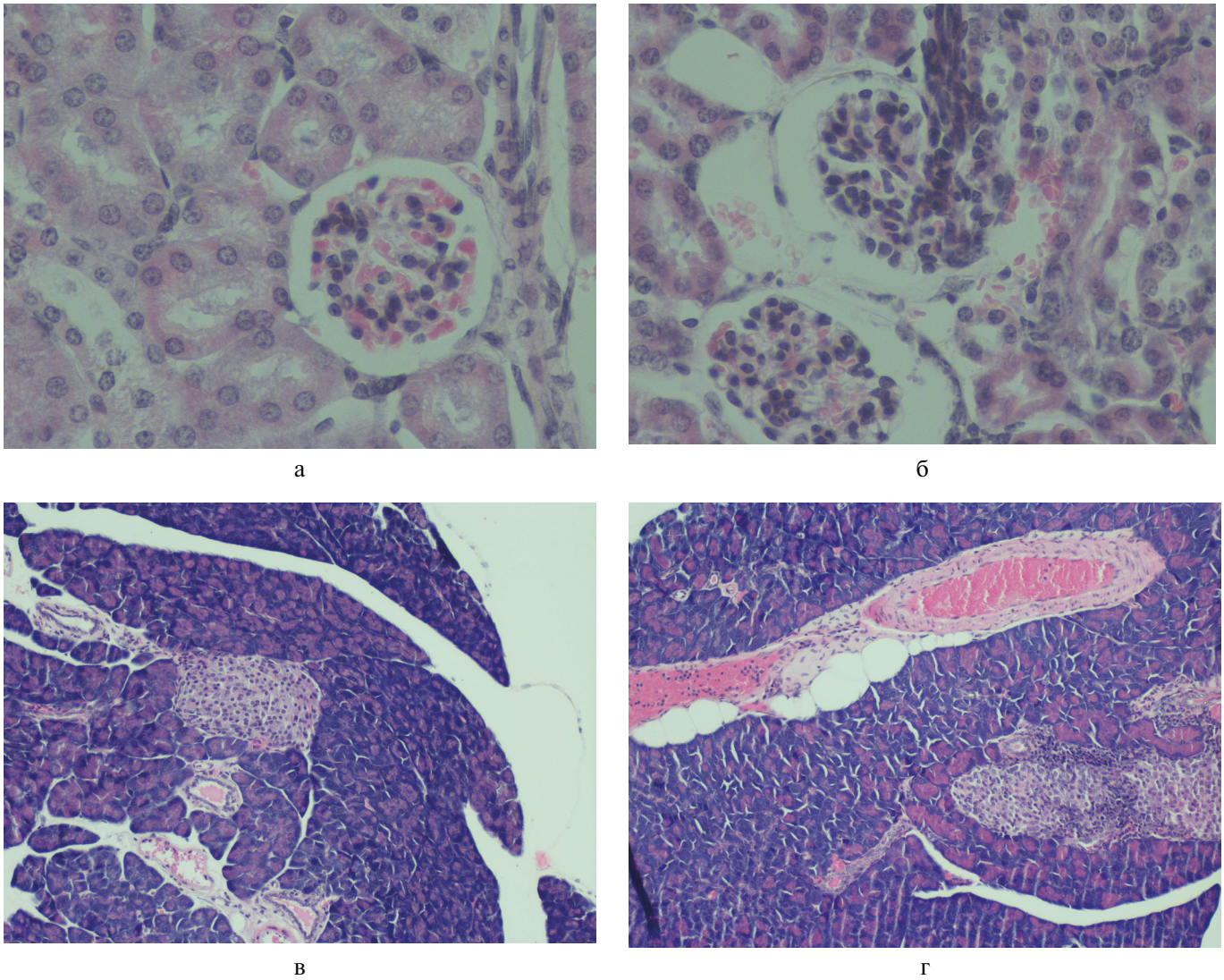


Рис. 2. Микрофотографии: фрагмента почки (а) контрольной мыши (×400), фрагмента почки (б) мыши после пятикратного введения стрептозотоцина (×400), фрагмента поджелудочной железы (в) контрольной мыши (×100), фрагмента поджелудочной железы (г) мыши после пятикратного введения стрептозотоцина (×100)
Fig. 2. Micrographs: fragment of the kidney (a) of the control mouse (×400), fragment of the kidney (б) of the mouse after five injections of streptozotocin (×400), fragment of the pancreas (в) of the control mouse (×100), fragment of the pancreas (г) of the mouse after five injections of streptozotocin (×100)

путём запуска механизмов клеточной гибели в ответ на окислительный стресс. Это косвенно подтверждается снижением количества атипичных комет и гипергликемии на позднем сроке по сравнению с ранним сроком наблюдения после многократного введения стрептозотоцина. При этом, не прояснённым остаётся отсутствие атипичных комет в печени при сроке 10 дней после однократного введения стрептозотоцина.

Обобщая совокупность полученных результатов, отметим, что в обоих вариантах эксперимента прослеживается удовлетворительное воспроизведение патогномонических признаков сахарного диабета. Эти признаки выражены более отчётливо и прослеживаются более связно в варианте с дробным, пятидневным введением стрептозотоцина в разовых дозах 40 мг/кг, что позволяет рекомендовать для моделирования сахарного диабета в доклинических исследованиях на мышах BALB/c именно этот вариант его экспериментального воспроизведения.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Сорокина Александра Валериановна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: alex54.sorokina@icloud.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9600-7244
к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Sorokina Alexandra V.
Corresponding author
e-mail: alex54.sorokina@icloud.com
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9600-7244
PhD, Cand. Sci. Biology, Leading researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Жанатаев Алий Курманович
e-mail: zhanataev@academpharm.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7673-8672
SPIN-код: 7070-0510
к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии мутагенеза, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Zhanataev Alii K.
e-mail: zhanataev@academpharm.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7673-8672
SPIN code: 7070-0510
PhD, Cand. Sci. Biology, leading researcher of the laboratory of pharmacology of mutagenesis FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Чайка Злата Владимировна
e-mail: pcr201069@yandex.ru
SPIN-код: 1680-2370
н. с. лаборатории фармакологии мутагенеза ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Chayka Zlata V.
e-mail: pcr201069@yandex.ru
SPIN code: 1680-2370
Research scientist of the laboratory of pharmacology of mutagenesis FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Мирошкина Ирина Александровна
e-mail: iris10.81@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3208-198X
SPIN-код: 4697-7938
н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Miroshkina Irina A.
e-mail: iris10.81@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3208-198X
SPIN code: 4697-7938
Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Лисицын Артём Андреевич
e-mail: nordical@yandex.ru
SPIN-код: 7857-1860
инженер лаборатории фармакологии мутагенеза ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Lisitsyn Artem A.
e-mail: nordical@yandex.ru
SPIN code: 7857-1860
engineer of the laboratory of pharmacology of Mutagenesis FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Дурнев Андрей Дмитриевич
e-mail: durnev@academpharm.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0218-8580
SPIN-код: 8426-0380
д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией лекарственной токсикологии, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Durnev Andrey D.
e-mail: durnev@academpharm.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0218-8580
SPIN code: 8426-0380
Dr. Sci (Med.), professor, corresponding member RAS, Head of the department of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global etiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Feb;14(2):88–98. DOI: 10.1038/nrendo.2017.151.

2. Tinajero MG, Malik VS. An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes: A Global Perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2021 Sep;50(3):337–355. DOI: 10.1016/j.ecl.2021.05.013.

3. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Feb;103(2):137–149. DOI: 10.1016/j.diabres.2013.11.002.

4. Спасов А.А., Воронкова М.П., Снигур Г.Л., Чепляева Н.И., Чепурнова М.В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. Биомедицина. 2011;(3):12–18. [Spasov AA, Vorohkova MP, Snegur GL, Cheplyaeva NI, Chepurnova MV. Experimental model of a type 2 diabetes. *Biomeditsina*. 2011;(3):12–18. (In Russ).].

5. Озерова И.В., Тарабан К.В., Ягубова С.С., Островская Р.У. Современное состояние проблемы моделирования сахарного диабета. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017;80(12):35–43. [Ozerova IV, Taraban KV, Yagubova SS, Ostrovskaya RU. Current state-of-the-art in diabetes modeling. *Eksperimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2017;80(12):35–43. (In Russ).] doi: 10.30906/0869-2092-2017-80-12-35-43.

6. Islam MS, Wilson RD. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol Biol*. 2012;933:161–174. DOI: 10.1007/978-1-62703-068-7_10.

7. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Modelsin Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;70:5.47.1-5.47.20. DOI: 10.1002/0471141755.ph0547s70.

8. Дурнев А.Д., Меркулов В.А., Жанатаев А.К., Никитина В.А., Воронина Е.С., Середенин С.Б. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. [Durnev AD, Merkulov VA, Zhanataev AK, Nikitina VA, Voronina ES, Seredenin SB. Guidelines for DNA damage assessing by alkaline gel electrophoresis of individual cells in pharmacological studies. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ).].

9. Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Чайка З.В., Мирошкина И.А., Дурнев А.Д. Феномен атипичных ДНК-комет. *Цитология*. 2017;59(3):163–168. [Zhanataev AK, Anisina EA, Chayka ZV, Miroshkina IA, Durnev A.D. Phenomenon of atypical DNA comets. *Citologija*. 2017;59(3):163–168. (In Russ).]. DOI: 10.1134/S1990519X17040113.

10. Møller P, Loft S. Statistical analysis of comet assay results. *Front Genet*. 2014;5:292. DOI: 10.3389/fgene.2014.00292.

11. Еремина Н.В., Жанатаев А.К., Лисицын А.А., Дурнев А.Д. Генотоксические маркеры у больных сахарным диабетом (обзор литературы). *Экологическая генетика*. 2021;19(2):143–168. [Eremina NV, Zhanataev AK, Lisitsyn AA, Durnev AD. Genotoxic markers in patients with diabetes mellitus (Literature review). *Ecological genetics*. 2021;19(2):143–168. (In Russ).]. DOI: 10/17816/ecogen65073.

12. Островская Р.У., Ягубова С.С., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Гудашева Т.А., Дурнев А.Д. Нейропротективный дипептид ноопепт предотвращает повреждения ДНК на модели преддиабета у мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;168(8):185–190. [Ostrovskaya RU, Yagubova SS, Zhanataev AK, Anisina EA, Gudasheva T.A., Durnev AD. The neuroprotective dipeptide noopept prevents DNA damage on the predia-betes model in mice. *Bull Exp Biol Med*. 2019;168(8):185–190 (In Russ).].

Исследование взаимодействия дипептидного миметика нейротрофина BDNF ГСБ-106 с тирозинкиназным рецептором TrkB с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса

Тарасюк А. В.[1], Мезенцев Ю. В.[2], Гнеденко О. В.[2], Поварнина П. Ю .[1], Иванов А. С.[2]

[1] – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

[2] – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), Москва, Российская Федерация

Аннотация. Методом поверхностного плазмонного резонанса изучено взаимодействие дипептидного миметика нейротрофина BDNF ГСБ-106 со специфическим для полноразмерного нейротрофина тирозинкиназным TrkB рецептором. Показано достоверное снижение связывания BDNF с TrkB, который был предварительно проинкубирован с ГСБ-106. Полученные данные указывают на взаимодействие ГСБ-106 с TrkB-рецептором.

Ключевые слова: нейротрофин; BDNF; TrkB; димерный дипептид миметик; оптический биосенсор; поверхностный плазмонный резонанс

Для цитирования:
Тарасюк А. В., Мезенцев Ю. В., Гнеденко О. В., Поварнина П. Ю., Иванов А. С. Исследование взаимодействия дипептидного миметика нейротрофина BDNF ГСБ-106 с тирозинкиназным рецептором TrkB с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(4):50–54. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-50-54
Поступила: 21 октября 2022 г. **Принята:** 17 ноября 2022 г. **Опубликована:** 24 декабря 2022 г.

Study of the interaction of the GSB-106 BDNF neurotrophin dipeptide mimetic with the TrkB tyrosine kinase receptor using surface plasmon resonance technology

Tarasiuk AV[1], Mezentsev YV[2], Gnedenko OV[2], Povarnina PYu[1], Ivanov AS[2]

[1] – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

[2] – Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russian Federation

Abstract. The interaction of the neurotrophin BDNF dipeptide mimetic, compound GSB-106, with the tyrosine kinase TrkB receptor specific for the full-sized neurotrophin was studied using surface plasmon resonance. The significant decrease in the binding of BDNF to TrkB, which was preincubated with GSB-106, was shown. The obtained data indicate the interaction of GSB-106 with the TrkB receptor.

Keywords: neurotrophin; BDNF; TrkB; dimeric dipeptide mimetic; optical biosensor; surface plasmon resonance

For citations:
Tarasiuk AV, Mezentsev YV, Gnedenko OV, Povarnina PYu, Ivanov AS. Study of the interaction of the GSB-106 BDNF neurotrophin dipeptide mimetic with the TrkB tyrosine kinase receptor using surface plasmon resonance technology. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(4): 50–54. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-50-54
Received: October 21, 2022. **Accepted:** November 17, 2022. **Published:** December 24, 2022.

Введение / Introduction

Мозговой нейротрофический фактор (brain derived neurotrophic factor, BDNF), относится к семейству нейротрофинов – эндогенных белков, которые играют ключевую роль в формировании нервной системы, поддержании её нормального функционирования и восстановлении в случае повреждений во взрослом организме [1]. Свои основные эффекты BDNF осуществляет через специфические тирозинкиназные TrkB рецепторы. Многочисленные экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о целесообразности использования нейротрофинов и их рецепторов в качестве молекулярных мишеней для создания средств лечения неврологических и психиатрических заболеваний [2–4].

Применение нативных нейротрофинов в клинике оказалось безуспешным из-за фармакокинетических ограничений и серьёзных побочных эффектов. Перспективным подходом для решения этих проблем полноразмерных нейротрофинов является создание их низкомолекулярных миметиков.

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова на основе структуры β-изгиба 4-й петли BDNF (-Asp^{93}-**Ser^{94}**-**Lys^{95}**-Lys^{96}-) был получен димерный дипептид, соединение ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-L-лизина) (рис. 1) [5].

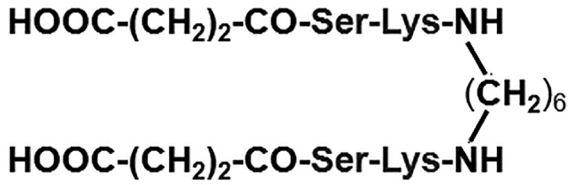


Рис. 1. Структура миметика BDNF ГСБ-106
Fig. 1. Structure of the BDNF GSB-106 mimetic

Методом Вестерн-блот-анализа на клетках HT-22 с использованием антител к фосфорилированной форме рецептора была показана активация TrkB рецептора при инкубации с ГСБ-106 в концентрации 10^{-8}M [6].

ГСБ-106 в концентрациях 10^{-6}–10^{-8} M проявлял нейропротекторную активность, защищая гиппокампальные нейроны линии HT-22 от окислительного стресса, с максимальным эффектом ~50 % от эффекта BDNF в его оптимальной концентрации10^{-9} M [6–8]. Нейропротекторный эффект был также выявлен на клетках HT-22 в условиях глутаматной токсичности и на клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y в условиях 6-OHDA – индуцированной токсичности [8], при этом в обоих случаях дипептид в концентрации 10^{-7} M проявлял такую же по выраженности активность, как и BDNF в концентрации 10^{-9} M.

Нейропротекторная активность ГСБ-106 была подтверждена *in vivo* на модели ишемического инсульта у крыс [6]. Кроме того, дипептид ГСБ-106 при системном введении проявлял выраженную антидепрессивную активность в батарее тестов и моделей на грызунах [9–12]. Эта активность полностью блокировалась специфическим антагонистом TrkB рецепторов [13].

Таким образом, результаты *in vitro* и *in vivo* исследований косвенно свидетельствуют о взаимодействии ГСБ-106 с TrkB рецептором, которое однако может быть и опосредованным.

Целью данной работы явилось подтверждение прямого взаимодействия ГСБ-106 с TrkB рецептором методом поверхностного плазмонного резонанса.

Материалы и методы / Materials and methods

Взаимодействие миметика BDNF ГСБ-106 с TrkB рецептором определялось с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре Biacore 3000 (Cytiva, США) с использованием чипа NTA (Cytiva, США). Регенерационный раствор (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, 0,35 M ЭДТА, 0,005 % сурфактант P20, pH 8,3) и рабочий буфер (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, 50 мкМ ЭДТА, 0,005 % сурфактант P20, pH 7,4) были получены от Cytiva. Экстраклеточный домен TrkB-ECD (Met1-His430), модифицированный по *N*-концу 6-ю остатками гистидина (HisTAG) был фирмы Sino Biological, КНР (каталожный номер 10047-H08H). Нейротрофин BDNF был фирмы Abcam, Великобритания (каталожный номер ab276774).

Соединение ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) был синтезирован в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» как описано в [5].

Эксперимент проводили по частично модифицированной методике [14]. Перед иммобилизацией рецептора TrkB на чипе его раствор (183 нМ) либо один (Контроль 1, К1), либо вместе с аналитами BDNF (360 нМ) (Контроль 2, К2) или ГСБ-106 (1 мМ) (Опыт, ГСБ-106), инкубировали в течение 1 ч при температуре 4 °C в темноте (см. Схему эксперимента, рис. 2).

Иммобилизация TrkB рецептора. Перед каждой иммобилизацией TrkB поверхность чипа отмывалась инжекцией регенерационного раствора в течение 1 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Активация поверхности рабочего канала осуществлялась инжекцией 0,5 мМ $NiCl_2$ в рабочем буфере в течение 1 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Далее проводили инжекцию предварительно инкубированных растворов, содержащих TrkB, в течение 10 мин при скорости потока 10 мкл/мин.

Выявление взаимодействия BDNF с иммобилизованным лигандом (TrkB) выполнялось при скорости потока 10 мкл/мин в рабочем буфере в течение 5 мин. Регистрировали сигнал биосенсора в единицах RU (Resonance Unit) на этапе иммобилизации рецептора и после инжекции BDNF. По изменению уровня сигнала биосенсора делали вывод о взаимодействии BDNF с рецептором.

После каждого анализа поверхность чипа обрабатывалась инжекцией регенерационного раствора в течение 3 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Отмывка удаляет с поверхности чипа иммобилизованный TrkB и ионы никеля. Эксперимент повторяли дважды. Достоверность результатов оценивали по среднеквадратичному отклонению по выборке методом парного сравнения.

Обработка результатов / Processing of results

Рассчитывали средние значения уровня сигнала биосенсора по двум измерениям в контроле 1, контроле 1 и опыте. Рассчитывали изменение сигнала биосенсора после внесения BDNF. Для удобства межгрупповых сравнений это изменение нормализовали по отношению к уровню сигнала до внесения BDNF с использованием следующей формулы:

(уровень сигнала 2 – уровень сигнала 1))*1000/ уровень сигнала 1,

где: уровень сигнала 1 – до внесения BDNF, а уровень сигнала 2 – после внесения BDNF.

Достоверность результатов оценивали с использованием среднеквадратичного отклонения нормализованного изменения уровня сигнала в группах, а именно, если среднеквадратичные отклонения двух выборок не перекрывались, то различия считали статистически значимыми.

Результаты и их обсуждение / Results and their discussion

В настоящее время в литературе представлены данные по связыванию BDNF и его миметиков Betrofina 3, Betrofina 4 и 7,8-дигидроксифлавона (7,8-DHF) с TrkB [14, 15]. В публикации датских учёных из университета

Копенгагена [15] методом плазмонного резонанса на приборе Biacore 2000 (Biacore AB, Швеция) с чипом CM4, на котором ковалентно был иммобилизован TrkB, определены константы связывания BDNF, Betrofina 3 и Betrofina 4 с рецептором TrkB – $5{,}4\cdot10^{-10}$ M, $1{,}8\cdot10^{-6}$ M и $1{,}3\cdot10^{-6}$ M, соответственно. Научной группой из Университета Атланты (Джорджия, США) [14] методом плазмонного резонанса на приборе Biacore T200 (Biacore AB, Швеция) с чипом NTA, который использовался и в нашем исследовании, были получены следующие значения констант связывания соединений с TrkB - K_d(BDNF) = $1{,}7\cdot10^{-6}$ M и K_d(7,8-DHF) = $1{,}54\cdot10^{-5}$ M. Стоит отметить, что полученные меньшие значения констант K_d могут быть связаны с использованием исследователями [14] в качестве рабочего раствора фосфатного буфера, который за счёт осаждения на чип нерастворимого фосфата никеля приводит к завышению сигнала оптического биосенсора. В нашем же исследовании в рабочем растворе содержался ЭДТА, который способен переводить ионы никеля в раствор за счёт хелатирования, тем самым занижая итоговый сигнал биосенсора.

В нашем исследовании TrkB рецептор был ориентированно иммобилизован на поверхности NTA-чипа. Были проведены 3 эксперимента по связыванию BDNF с TrkB (рис. 2). В первом контрольном эксперименте (K1) рецептор был иммобилизован после инкубации и далее инжектировали раствор 360 нМ BDNF в рабочем буфере. В этих условиях сигнал биосенсора увеличился в среднем на 1330 RU по отношению к уровню сигнала до внесения BDNF (табл. 1, рис. 3), что свидетельствует о связывании нейротрофина с рецептором. Во втором контрольном эксперименте

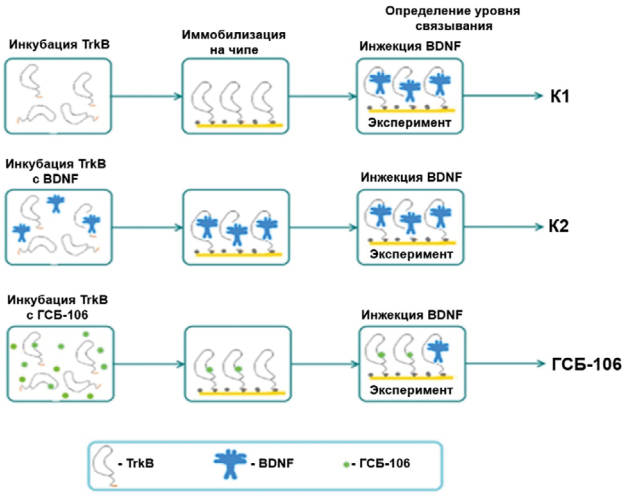


Рис. 2. Схема эксперимента по связыванию аналитов с TrkB

Примечания: K1 (Контроль 1) – инжекция BDNF после инкубации рецептора без аналита; K2 (Контроль 2) – инжекция BDNF после инкубации рецептора с BDNF; ГСБ-106 (Опыт) – инжекция BDNF после инкубации рецептора с ГСБ-106.

Fig. 2. Scheme of the experiment on the binding of analytes with TrkB

Notes: K1 (Control 1) – injection of BDNF after incubation of the receptor without analyte; K2 (Control 2) – injection of BDNF after incubation of the receptor with BDNF; ГСБ-106 (Опыт) – injection of BDNF after incubation of the receptor with GSB-106.

(K2) рецептор был предварительно проинкубирован с BDNF и далее иммобилизован на чипе. Инжекция раствора 360 нМ BDNF не приводила к изменению сигнала биосенсора, что указывает на то, что места связывания на рецепторе заняты (в предварительной инкубации). В третьем эксперименте (Опыт, ГСБ-106)

Таблица 1

Предварительная инкубации TrkB рецепторов с дипептидным миметиком BDNF ГСБ-106 ухудшает взаимодействие BDNF с TrkB

Table 1

Pre-incubation of TrkB receptors with the dipeptide mimetic BDNF GSB-106 worsens the interaction of BDNF with TrkB

Группа	Условия эксперимента	Уровень сигнала до инжекции BDNF, RU	Изменение уровня сигнала после инжекции BDNF, RU	Нормализованное изменение уровня сигнала после инжекции BDNF[1], RU
Контроль 1	Инкубация TrkB + инжекция BDNF	1010±20	+1350±40	+1330±60
Контроль 2	Инкубация TrkB с BDNF + инжекция BDNF	4700±200	0	0*
Опыт	Инкубация TrkB с ГСБ-106 + инжекция BDNF	1240±20	+1170±90	+940±70*

Примечания: Данные поверхностного плазмонного резонанса. Уровень взаимодействия BDNF с TrkB определяли по изменению сигнала биосенсора до и после инжекции нейротрофина.
Данные представлены в виде средних по двум измерениям и среднеквадратичных отклонений.
[1] – Для удобства межгрупповых сравнений изменение уровня сигнала после инжекции BDNF нормализовали с использованием следующей формулы: (уровень сигнала 2 – уровень сигнала 1)*1000/уровень сигнала 1, где: уровень сигнала 1 – до внесения BDNF, а уровень сигнала 2 – после внесения BDNF; * – статистическая значимость различий по отношению к контролю (среднеквадратичные отклонения выборок не перекрываются).
Notes: Surface plasmon resonance data. The level of interaction between BDNF and TrkB was determined by changing the biosensor signal before and after neurotrophin injection. The data are presented in the form of two-dimensional averages and standard deviations.
[1] – For the convenience of intergroup comparisons, the change in signal level after injection of BDNF was normalized using the following formula: (signal level 2 – signal level 1))*1000/signal level 1, where signal level 1 is before the introduction of BDNF, and signal level 2 is after the introduction of BDNF; * – the statistical significance of the differences in relation to the control (the standard deviations of the samples do not overlap).

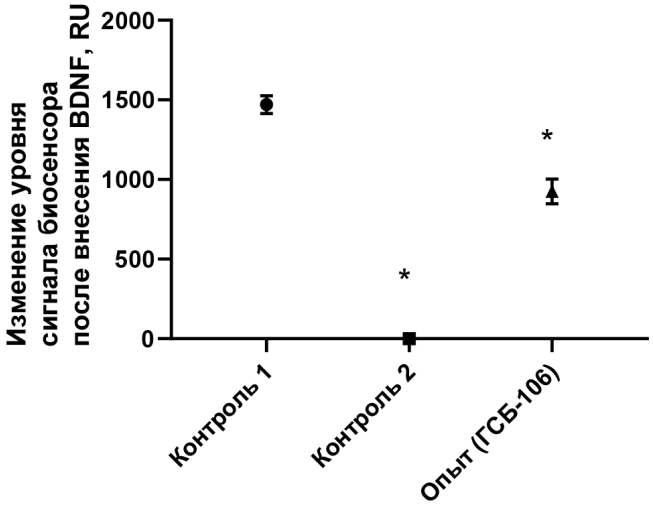


Рис. 3. Предварительная инкубации TrkB рецепторов с дипептидным миметиком BDNF ГСБ-106 ухудшает взаимодействие BDNF с TrkB

Примечания: Данные поверхностного плазмонного резонанса. Уровень взаимодействия BDNF с TrkB определяли по изменению сигнала биосенсора до и после инжекции нейротрофина.

Данные представлены в виде средних по двум измерениям и среднеквадратичных отклонений.

1 – Для удобства межгрупповых сравнений изменение уровня сигнала после инжекции BDNF нормализовали с использованием следующей формулы: (уровень сигнала 2 – уровень сигнала 1))*1000/уровень сигнала 1, где уровень сигнала 1 – до внесения BDNF, а уровень сигнала 2 – после внесения BDNF; * – статистическая значимость различий по отношению к контролю (среднеквадратичные отклонения выборок не перекрываются).

Fig. 3. Preincubation of TrkB receptors with the dipeptide mimetic BDNF GSB-106 worsens the interaction of BDNF with TrkB

Notes: Surface plasmon resonance data. The level of interaction between BDNF and TrkB was determined by changing the biosensor signal before and after neurotrophin injection.

The data are presented in the form of two-dimensional averages and standard deviations.

1 – For the convenience of intergroup comparisons, the change in signal level after injection of BDNF was normalized using the following formula: (signal level 2 – signal level 1))*1000/signal level 1, where signal level 1 is before the introduction of BDNF, and signal level 2 is after the introduction of BDNF; * – the statistical significance of the differences in relation to the control (the standard deviations of the samples do not overlap).

TrkB рецептор был предварительно проинкубирован с ГСБ-106, в этом случае увеличение уровня сигнала биосенсора при инжекции раствора 360 нМ BDNF (940 RU) было статистически значимо ниже, чем в контроле 1 (1330 RU) (см. табл. 1, рис. 3). Таким образом, предварительная инкубация рецептора с ГСБ-106 приводила к статистически значимому снижению на 30 % уровня взаимодействия между BDNF и TrkB, что указывает на возможность непосредственного взаимодействия миметика BDNF ГСБ-106 с рецептором.

Заключение / Conclusion

В результате исследования методом поверхностного плазмонного резонанса установлено, что предварительная инкубация TrkB с ГСБ-106 приводит к статистически значимому снижению сигнала оптического биосенсора при взаимодействии BDNF с TrkB, что свидетельствует о возможности прямого взаимодействия ГСБ-106 с TrkB.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ/ ADDITIONAL INFORMATION

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

Acknowledgements. The work was performed using the equipment of the CCP «Human Proteome» of the V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry

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

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

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Тарасюк Алексей Валерьевич
e-mail: tarasiuk86@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9750-4157
SPIN-код: 9670-2415
с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Tarasiuk Aleksey V.
e-mail: tarasiuk86@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9750-4157
SPIN code: 9670-2415
Senior Researcher of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Мезенцев Юрий Владимирович
e-mail: yu.mezentsev@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9932-515X
SPIN-код: 1917-3269
к. б. н., с. н. с. лаборатории межмолекулярных взаимодействий ИБМХ, Москва, Российская Федерация

Mezentsev Yuri V.
e-mail: yu.mezentsev@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9932-515X
SPIN code: 1917-3269
PhD, Cand. Sci. Biology, Senior Researcher of the laboratory of molecular interactions, IBMC, Moscow, Russian Federation

Гнеденко Оксана Валентиновна
e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7426-9235
к. б. н., с. н. с. лаборатории межмолекулярных взаимодействий ИБМХ, Москва, Российская Федерация

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

Иванов Алексей Сергеевич
e-mail: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7022-6748
SPIN-код: 6456-4643
д. б. н., заведующий лабораторией межмолекулярных взаимодействий ИБМХ, Москва, Российская Федерация

Gnedenko Oksana V.
e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7426-9235
PhD, Cand. Sci. Biology, Senior Researcher of the laboratory of molecular interactions, IBMC, Moscow, Russian Federation

Povarnina Polina Yu.
Corresponding author
e-mail: povarnina@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-3278-8915
SPIN code: 5498-6724
PhD, Cand. Sci. Biology, Senior research scientist of the of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Ivanov Alexey S.
e-mail: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7022-6748
SPIN code: 6456-4643
PhD, Cand. Sci. Biology, Head of the laboratory of molecular interactions, IBMC, Moscow, Russia of molecular interactions, IBMC, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Skaper SD. Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2018;1727:1–17. DOI: 10.1007/978-1-4939-7571-6_1.

2. Aloe L, Rocco ML, Balzamino BO, Micera A. Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy. *Curr Neuropharmacol*. 2015;13(3):294–303. DOI: 10.2174/1570159x13666150403231920.

3. Cai J, Hua F, Yuan L, et al. Potential therapeutic effects of neurotrophins for acute and chronic neurological diseases. *Biomed Res Int*. 2014;2014:601084. DOI: 10.1155/2014/601084.

4. Castrén E. Neurotrophins and psychiatric disorders. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;220:461–479. DOI: 10.1007/978-3-642-45106-5_17.

5. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В. и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора. *Биоорганическая химия*. 2012;38(3):280–290. [Gudasheva TA, Tarasiuk AV, Pomogaibo SV, et al. Design and synthesis of dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 2012;38(3):280–290. (In Russ).]. DOI: 10.1134/s1068162012030053.

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

7. Gudasheva TA, Povarnina P, Tarasiuk AV, Seredenin SB. The Low Molecular Weight Brain-derived Neurotrophic Factor Mimetics with Antidepressant-like Activity. *Curr Pharm Des*. 2019;25(6):729–737. DOI: 10.2174/1381612825666190329122852.

8. Логвинов И.О., Антипова Т.А., Гудашева Т.А. и др. Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах *in vitro*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013;155(3):319–322. [Logvinov IO, Antipova TA, Gudasheva TA, et al. Neuroprotective effects of dipeptide analogue of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 *in vitro* experiments. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013;155(3):319–322. (In Russ).].

9. Gudasheva TA, Povarnina PY, Tarasiuk AV, Seredenin SB. Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Design and pharmacological properties. *Med Res Rev*. 2021;41(5):2746–2774. DOI: 10.1002/med.21721.

10. Поварнина П.Ю., Гарибова Т.Л., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора обладает свойствами антидепрессанта при пероральном введении. *Acta Naturae*. 2018;10(3(38)):88–92. [Povarnina PYu, Garibova TL, Gudasheva TA, Seredenin SB. Antidepressant Effect of an Orally Administered Dipeptide Mimetic of the Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Acta Naturae*. 2018;10(3(38)):88–92. (In Russ).].

11. Межлумян А.Г., Таллерова А.В., Поварнина П.Ю., Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Гудашева Т.А. Скрининговое изучение эффектов миметиков фактора роста нервов и мозгового нейротрофического фактора на экспериментальной модели депрессии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2020;(1):11–17. [Mezhlumyan AG, Tallerova AV, Povarnina PYu, Sazonova NM, Tarasiuk AV, Gudasheva TA. Screening study of nerve growth factor's and brain-derived neurotrophic factor's mimetics effects at the experimental depression model. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):11–17. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-11-17.

12. Поварнина П.Ю., Таллерова А.В., Межлумян А.Г. и др. Антидепрессивная активность димерного дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 при однократном пероральном введении на модели социального стресса у мышей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2020;83(4):3–7. [Povarnina PYu, Tallerova AV, Mezhlumian AG, et al. Dimeric dipeptide bdnf mimetic GSB-106 exhibits antidepressant-like activity upon single oral administration in mice under social stress model conditions. *Éksperimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*. 2020;83(4):3–7. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-4-3-7.

13. Gudasheva TA, Tallerova AV, Mezhlumyan AG, et al. Low-molecular weight bdnf mimetic, dimeric dipeptide GSB-106, reverses depressive symptoms in mouse chronic social defeat stress. *Biomolecules*. 2021:11(2):252. DOI: 10.3390/biom11020252.

14. Liu X, Obianyo O, Chan CB, et al. Biochemical and biophysical investigation of the brain-derived neurotrophic factor mimetic 7,8-dihydroxyflavone in the binding and activation of the TrkB receptor. *J Biol Chem*. 2014;289(40):27571–27584. DOI: 10.1074/jbc.M114.562561.

15. Fobian K, Owczarek S, Budtz C, et al. Peptides derived from the solvent-exposed loops 3 and 4 of BDNF bind TrkB and p75(NTR) receptors and stimulate neurite outgrowth and survival. *J Neurosci Res*. 2010:88(6):1170–1181. DOI: 10.1002/JNR.22285.

Оценка фармакологической безопасности нового дипептидного миметика 2-й петли BDNF при совместном введении с этанолом

Надорова А. В., Григоревских Е. М., Тарасюк А. В., Сазонова Н. М., Колик Л. Г.

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

Аннотация. Для оценки фармакологической безопасности дипептидного миметика 2-й петли BDNF (соединение ГТС-201) при совместном введении с этанолом изучено его влияние на изменение двигательной активности, вызываемое этанолом при остром и субхроническом введении у мышей C57Bl/6 и DBA/2. Установлено, что ГТС-201 в дозе 5,0 мг/кг, в/б, не влияя на спонтанную двигательную активность per se, при предварительном однократном введении препятствовал развитию седативной реакции, вызываемой этанолом (2,0 г/кг, в/б) у мышей C57Bl/6. При субхроническом введении ГТС-201 лишён психостимулирующего действия и влияния на формирование поведенческой сенсибилизации, индуцированной этанолом, у мышей DBA/2. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии в фармакологическом профиле ГТС-201 психостимулирующего компонента и синергизма при использовании с этанолом в низкой дозе.

Ключевые слова: миметик BDNF; двигательная активность; поведенческая сенсибилизация; этанол; мыши

Для цитирования:
Надорова А. В., Григоревских Е. М., Тарасюк А. В., Сазонова Н. М., Колик Л. Г. Оценка фармакологической безопасности нового дипептидного миметика 2-й петли BDNF при совместном введении с этанолом. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(4):55–61. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-55-61
Поступила: 21 октября 2022 г. **Принята:** 06 ноября 2022 г. **Опубликована:** 24 декабря 2022 г.

Assessment of pharmacological safety of a new dipeptide mimetic of the 2nd loop of BDNF when co-administered with ethanol

Nadorova AV, Grigorevskikh EM, Tarasiuk AV, Sazonova NM, Kolik LG
FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russian Federation

Abstract. To assess the pharmacological safety of the dipeptide mimetic of the 2nd loop of BDNF (compound GTS-201) when co-administered with ethanol, its effect on the alteration in motor activity induced by ethanol during acute and subchronic administration in mice C57Bl/6 and DBA/2 was studied. It was found that GTS-201 at a dose of 5.0 mg / kg, i.p., without affecting spontaneous motor activity per se, after a preliminary acute administration prevented the development of a sedative reaction caused by ethanol (2.0 g/ kg, i.p.) in C57Bl/6 mice. After subchronic administration, GTS-201 is devoid of psychostimulant effect and impact on the formation of ethanol-induced behavioral sensitization in DBA/2 mice. The data obtained indicate the absence of a psychostimulant component and synergism in the pharmacological profile of GTS-201 when used with ethanol at low dose.

Keywords: BDNF mimetic; locomotor activity; behavioral sensitization; ethanol; mice

For citations:
Nadorova AV, Grigorevskikh EM, Tarasiuk AV, Sazonova NM, Kolik LG. Assessment of pharmacological safety of a new dipeptide mimetic of the 2nd loop of BDNF when co-administered with ethanol. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(4):55–61. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-55-61
Received: October 21, 2022. **Accepted:** November 06, 2022. **Published:** December 24, 2022

Введение / Introduction

Фармакоэпидемиологические исследования, проведённые с различным дизайном, продолжительностью и инструментами оценки, выявили, что показатели распространённости потенциальных лекарственных взаимодействий, которые могут быть предсказаны на основе известных фармакологических свойств лекарственных средств, варьируют от 5 до 91 % [1]. Лекарственные взаимодействия рассматриваются сегодня как ключевая причина возникновения нежелательных побочных реакций на фармакологические средства, при этом от 42 до 62 % побочных реакций в амбулаторных условиях могут быть предотвращены [2].

Этиловый спирт (этанол, алкоголь) является наиболее употребляемым легальным психоактивным веществом, уровень потребления которого в настоящее время остаётся высоким во всём мире [3]. Существует несколько потенциальных механизмов взаимодействия алкоголя с лекарственными препаратами. Во-первых, этанол может взаимодействовать с субстратами, ингибиторами или индукторами алкогольдегидрогеназы (CYP2E1), фермента, который участвует в метаболизме этанола и ингибируется этанолом [4]. Во-вторых, при использовании с другими препаратами центрального действия, например, бензодиазепинами, опиоидами, этанол может усиливать угнетающий эффект на центральную нервную систему (ЦНС), что увеличивает риск развития седативной реакции и психомоторных нарушений у пациента [5, 6]. Большинство взаимодействий между лекарственными средствами и этанолом обусловлено последним механизмом.

Согласно экспериментальным исследованиям, многие психотропные препараты изменяют степень или продолжительность нарушения психомоторных функций, индуцированных алкоголем [7–9]. Гиперлокомоторная реакция в ответ на острое введение этанола проявляется у мышей линии DBA/2, но не у

C57Bl/6, и связана с увеличением числа Fos-подобных иммунореактивных нейронов (предполагаемый показатель синаптической активности) в центральном ядре миндалины (CeA) [10]. Подобно этанолу, хлордиазепоксид увеличивает двигательную активность у мышей DBA/2, которые в 10 раз более чувствительны в отношении активации CeA, чем мыши C57Bl/6, что подчёркивает важность механизмов, опосредованных ГАМК(А)-рецепторами, в развитии локомоторной реакции, индуцированной этанолом [11]. Диазепам снижает стимулирующее действие этанола на спонтанную двигательную активность у мышей [8]. При формировании этанол-индуцированной поведенческой сенсибилизации (ЭИПС), которая используется в доклинических исследованиях как модель нейроадаптации, возникающей после повторного воздействия этанола, и, как предполагается, играет роль на ранних этапах формирования алкогольной зависимости, диазепам при субхроническом введении резистентным к развитию ЭИПС мышам DBA/2J способствует более выраженному проявлению (экспрессии) сенсибилизации после отмены этанола [12]. Представленные данные иллюстрируют тот факт, что применение анксиолитиков бензодиазепинового ряда на фоне действия этанола провоцирует формирование повышенной чувствительности к алкоголю, следовательно, разработка новых лекарственных препаратов, влияющих на ЦНС, должна включать оценку их фармакологической безопасности при совместном применении с этанолом.

Опираясь на оригинальную гипотезу о взаимодействии нейротрофинов с рецепторами с помощью наиболее экспонированных участков их петлеобразных структур, связанных с реализацией определённых биологических эффектов, в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова сконструирован и синтезирован димерный дипептидный миметик 2-й петли мозгового нейротрофического фактора (BDNF) гексаметилендиамид *бис*-(-*N*-гексаноил-*L*-серил-*L*-лизина), или соединение ГТС-201 (рис. 1), который в опытах *in vitro* при взаимодействии с тропомиозиновым тирозинкиназным B (TrkB) рецептором инициировал

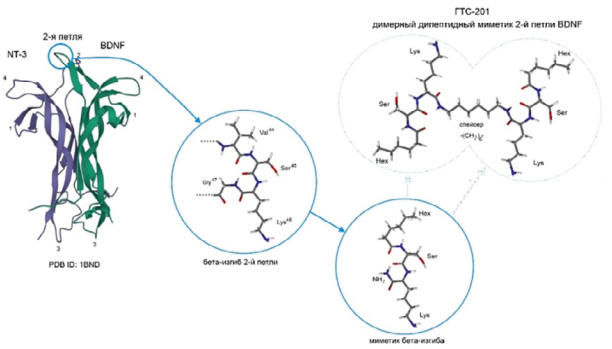


Рис. 1. Схема дизайна и структура соединения ГТС-201
Fig. 1. Design and structure of the GTS-201

нисходящую сигнализацию через митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK) и фосфолипазу Cγ (PLCγ) [13, 14].

В опытах *in vivo* соединение ГТС-201 проявляло анксиолитическую активность [15], не потенцировало наркотическое действие этанола и снижало сформированную алкогольную мотивацию у крыс [16]. Однако сведения о взаимодействии ГТС-201 с этанолом в низкой дозе при различных режимах введения в настоящее время отсутствуют. Цель данной работы – изучение влияния низкомолекулярного миметика 2-й петли BDNF на вызываемые этанолом при остром и субхроническом введении изменения спонтанной двигательной активности у мышей.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Эксперименты выполнены на мышах-самцах линий C57Bl/6 (n = 47) и DBA/2 (n = 46) с массой тела 22–24 г (питомник Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Животных содержали по 15 особей в клетке стандарта Т/3 в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при регулируемом световом режиме 12 ч / 12 ч (свет / темнота) и постоянной температуре (21–23 °C) со свободным доступом к воде и гранулированному корму (ГОСТ Р 50258-92) в течение 10 суток до начала тестирования. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Препараты. Миметик 2-й петли BDNF ГТС-201, субстанция, синтезированная в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в дозе 5 мг/кг, внутрибрюшинно (в/б) и спирт этиловый ректификированный 20 % из пищевого сырья «Экстра» (ГОСТ Р 51652-2000) в дозе 2 г/кг, растворяли в воде для инъекций и вводили однократно из расчёта 0,1 мл/10 г массы животного согласно схеме эксперимента. Животные контрольных групп получали воду для инъекций в эквивалентных объёмах.

Поведенческие исследования. Спонтанную двигательную активность мышей оценивали в актометре Opto-Varimex 4 (Columbus Instruments, США). Установка представляет собой квадратную плексигласовую арену со сторонами 42 × 42 см и высотой 20 см. По периметру арены расположены чувствительные оптоэлектронные датчики (λ = 875 нм) на высоте 2 см от пола, автоматически регистрирующие поминутно параметры двигательной активности животных и передающие их на блок управления, соединенный с компьютером. Регистрировали показатели спонтанной двигательной активности: пройденное расстояние в сантиметрах, состояние покоя (движение не обнаружено) в секундах, вертикальная активность в условных единицах, стереотипное поведение (мелкие движения) в секундах. Мышей помещали в актометр непосредственно после второй инъекции.

Этанол-индуцированное снижение спонтанной двигательной активности моделировали в соответствие с ранее описанной методикой [17]. *Схема 1-го эксперимента.* Мыши C57Bl/6 были разделены на четыре группы: 1-я группа «Контроль» (вода для инъекций – экспозиция 30 мин – вода для инъекций – посадка в актометр) $n = 12$; 2-я группа «ГТС-201» (ГТС-201 в дозе 5 мг/кг – экспозиция 30 мин – вода для инъекций – посадка в актометр) $n = 10$; 3-я группа «Этанол» (вода для инъекций – экспозиция 30 мин – 20 % раствор этанола в дозе 2 г/кг – посадка в актометр) $n = 12$; 4-я группа «ГТС-201+Этанол» (ГТС-201 в дозе 5 мг/кг – экспозиция 30 мин – 20 % раствор этанола в дозе 2 г/кг – посадка в актометр) $n = 13$. Двигательную активность регистрировали непрерывно в течение 20 мин.

Этанол-индуцированное формирование поведенческой сенсибилизации моделировали в соответствие с ранее описанной методикой [18]. *Схема 2-го эксперимента.* Мыши DBA/2 были разделены на четыре группы. Препараты вводили в течение 9 дней 1 раз в сутки согласно схеме эксперимента: 1-я группа «Контроль» (вода для инъекций – экспозиция 30 мин – вода для инъекций) $n = 12$; 2-я группа «ГТС-201» (ГТС-201 в дозе 5 мг/кг – экспозиция 30 мин – вода для инъекций) $n = 12$; 3-я группа «Этанол» (вода для инъекций – экспозиция 30 мин – 20 % раствор этанола в дозе 2 г/кг) $n = 10$; 4-я группа «ГТС-201+Этанол» (ГТС-201 в дозе 5 мг/кг – экспозиция 30 мин – 20 % раствор этанола в дозе 2 г/кг) $n = 12$. Спонтанную двигательную активность мышей регистрировали в 0 (фон), 1 и 9 день эксперимента. Двигательную активность регистрировали непрерывно в течение 10 мин.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи Т-критерия Стьюдента, однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и ANOVA для повторных измерений с последующим использованием критерия Дункана. Критический уровень значимости $\alpha = 0{,}05$. Данные представлены в виде M ± SEM: M – средние значения, SEM – стандартная ошибка среднего, n – количество животных в экспериментальной группе.

Результаты и обсуждение / Results and Discussion

Влияние ГТС-201 при остром введении на вызываемое этанолом снижение двигательной активности у мышей C57Bl/6

На первом этапе эксперимента определена динамика изменения спонтанной двигательной активности в течение 20 мин после введении этанола у мышей C57BL/6. На рис. 2 показано, что этанол вызывает резкое снижение общей двигательной активности, оцениваемой по пройденному расстоянию, сначала на 3-й минуте ($p < 0{,}05$), а затем с 10-й по 14-ю минуты ($p < 0{,}05$; $p < 0{,}01$) наблюдений по сравнению с контрольной группой. На втором этапе выполнена оценка влияния ГТС-201 при предварительном введении на индуцированную этанолом гиполокомоторную реакцию в интервале с 10-й по 14-ю минуты.

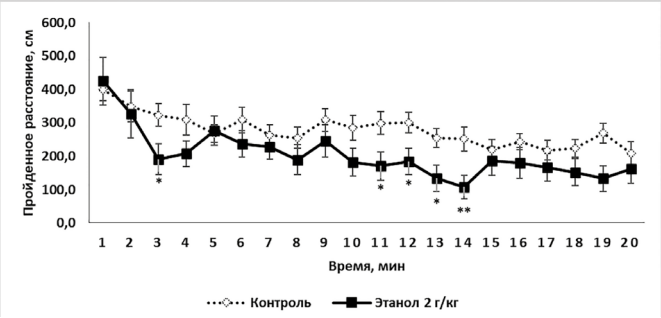


Рис. 2. Динамика изменения двигательной активности мышей C57Bl/6 при однократном введении этанола в дозе 2 г/кг (M±SEM)
Примечание: * – $p < 0{,}05$ статистически значимые отличия по отношению к соответствующей точке группы «Контроль», согласно критерию Стьюдента

Fig. 2. Dynamics of changes in the motor activity of C57Bl/6 mice after acute ethanol at a dose of 2 g/kg (M ± SEM)
Note: * – $p < 0.05$ statistically significant differences in relation to the "Control" group according to the Student's t-test.

Дипептидный миметик BDNF не влиял на спонтанную двигательную активность мышей в течение 20 мин наблюдения, вместе с тем ГТС-201 препятствовал снижению пройденного расстояния и увеличению состояния покоя, вызываемых этанолом (рис. 3, А-Б). Кроме того, ГТС-201 частично предотвращал этанол-индуцированное снижение вертикальной активности (рис. 3, В) и не влиял при самостоятельном и совместном с этанолом введении на продолжительность стереотипного поведения (рис. 3, Г).

Влияние ГТС-201 при субхроническом введении на формирование поведенческой сенсибилизации, вызываемой этанолом у мышей линии DBA/2

Моделирование поведенческой сенсибилизации выполняли на мышах линии DBA/2, которые были предварительно разделены на экспериментальные группы и не отличались по фоновым значениям общей двигательной активности. При субхроническом введении в эффективной дозе ГТС-201 ***per se*** не вызывал формирование двигательной сенсибилизации, характерной для веществ с психостимулирующим действием (рис. 4, А-Г). Напротив, этанол в дозе 2,0 г/кг при субхроническом введении значительно увеличивал пройденное расстояние в 1-й день ($p < 0{,}05$) и особенно на 9-й день ($p < 0{,}001$) по сравнению с контрольной группой. В отличие от мышей C57Bl/6, у мышей DBA/2 этанол не влиял на время пребывания в состоянии покоя ни в один из дней наблюдения (рис. 4, Б) и значительно снижал ($p < 0{,}05$) время стереотипии по сравнению с контрольной группой (рис. 4, Г).

При предварительном введении ГТС-201 в дозе 5,0 мг/кг не оказывал статистически значимого влияния на характер спонтанной двигательной активности, индуцированной этанолом, как в 1-й, так и

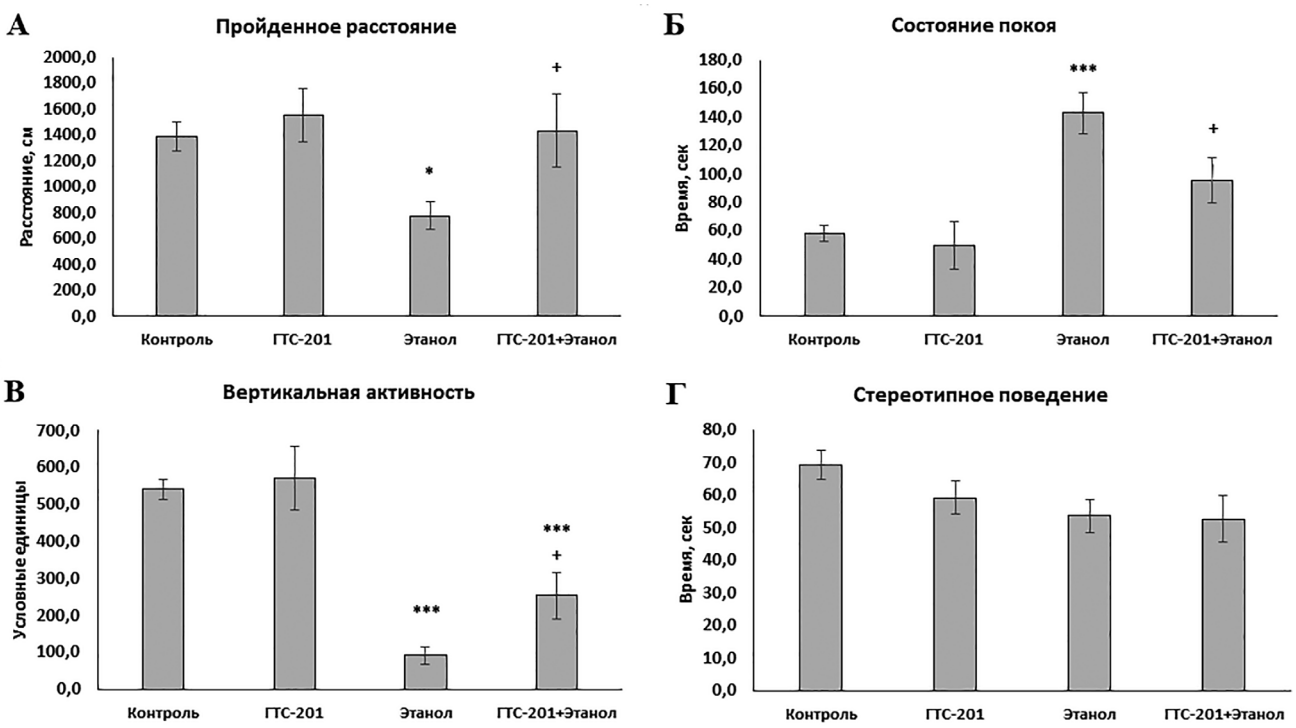


Рис. 3. Влияние ГТС-201 на восстановление двигательной активности у мышей линии C57Bl/6, сниженной под действием этанола в интервале с 10-й по 14-ю минуту (M±SEM)

Примечания: Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA: **А.** Пройденное расстояние – F(3, 43) = 3,1154; p = 0,03586; **Б.** Состояние покоя – F(3, 43) = 9,2371; p = 0,00008; **В.** Вертикальная активность – F(3, 43) = 18,165, p = 0,00000; **Г.** Стереотипное поведение – F(3, 43) = 1,8611, p = 0,15051; * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ – статистически значимо по отношению к группе «Контроль»; + – $p < 0,05$ – статистически значимо по отношению к группе «Этанол» согласно критерию Дункана.

Fig. 3. The effect of GTS-201 on the recovery of motor activity in C57Bl/6 mice, reduced by ethanol from 10 to 14 minutes after administration (M±SEM)

Notes: ANOVA: **«А»** – The distance traveled F(3, 43) = 3.1154; p = 0.03586; **«Б»** – The resting time F(3, 43) = 9.2371; p = 0.00008; **«В»** – The vertical activity F(3, 43) = 18.165; p = 0.00000; **«Г»** – The stereotypic time F(3, 43) = 1.8611; p = 0.15051; * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$ – statistically significant in relation to the «Control» group; + – $p < 0.05$ – statisti-cally significant in relation to the «Ethanol» group according to Duncan's test.

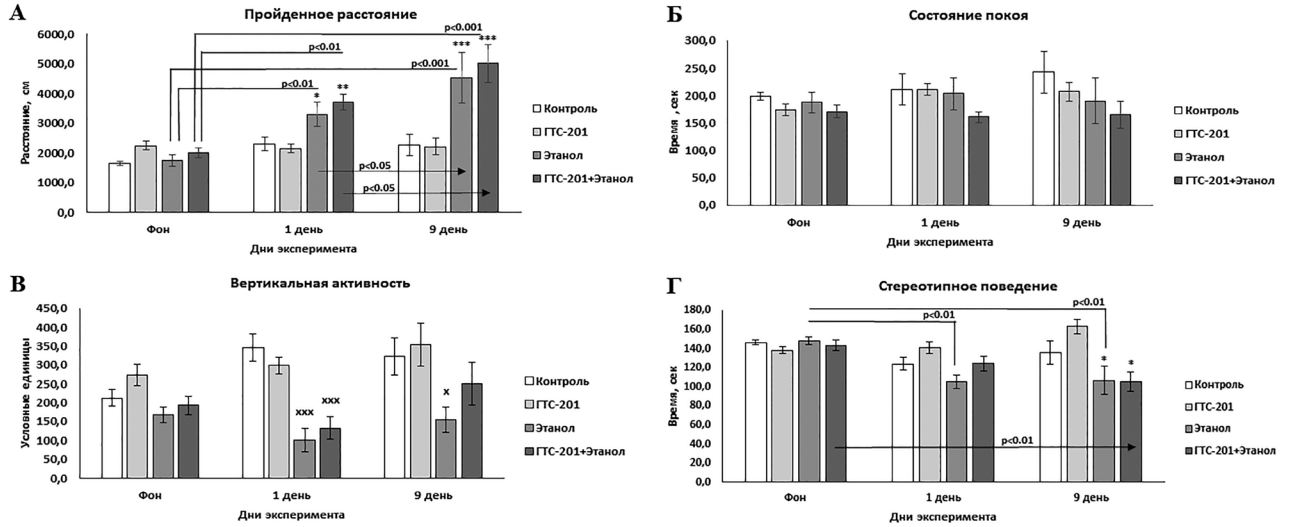


Рис. 4. ГТС-201 не влияет на формирование поведенческой сенсибилизации, вызываемой этанолом у мышей линии DBA/2 (M±SEM)

Примечания: ANOVA для повторных измерений: **А.** Пройденное расстояние – F(6, 84) = 4,8941; p = 0,00025; **Б.** Состояние покоя – F(6, 84) = 0,41710; p = 0,86576; **В.** Вертикальная активность – F(6, 84) = 1,9283; p = 0,08622; **Г.** Стереотипное поведение – F(6, 84) = 4,3150; p = 0,00077; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по отношению к соответствующему «Контролю» согласно критерию Дункана; x – $p < 0,05$, xxx – $p < 0,001$ по отношению к соответствующему «Контролю» согласно критерию Стьюдента.

Fig. 4. GTS-201 does not affect the formation of ethanol-induced behavioral sensitization in DBA mice/2 (M±SEM)

Notes: ANOVA for repeated measurements: **«А»** – the distance traveled F(6, 84) = 4.8941; p = 0.00025; **«Б»** – the resting time F(6, 84) = 0.41710; p = 0.86576; **«В»** – the vertical activity F(6, 84) = 1.9283; p = 0.08622; **«Г»** – the stereotypic time F(6, 84) = 4.3150; p = 0.00077; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ in relation to the corresponding «Control» according to Duncan's test; x – $p < 0.05$; xxx – $p < 0.001$ in relation to the corresponding «Control» according to the Student's t-test.

на 9-й день наблюдений, что указывает на отсутствие синергетического действия миметика BDNF и алкоголя в низкой дозе при однократном и субхроническом введении (рис. 4).

Обсуждение / Discussion

В настоящей работе в опытах *in vivo* установлено отсутствие психостимулирующего компонента в спектре фармакологической активности дипептидного миметика 2-й петли BDNF в дозе, обладающей анксиолитическим и антиаддиктивным действием, а также экспериментально доказана фармакологическая безопасность миметика BDNF при совместном использовании с этанолом в дозе 2 г/кг на примере влияния на спонтанную двигательную активность у мышей. Ранее сходные результаты были получены при изучении некоторых небензодиазепиновых анксиолитиков. Синтезированный гептапептидный аналог эндогенного тафтсина селанк, в отличие от ГТС-201, ослаблял индуцированную этанолом гиперлокомоторную реакцию у мышей DBA/2 в 1-й день эксперимента, но в целом к 10-му дню наблюдений также не влиял на процесс формирования сенсибилизации к этанолу [18]. Препарат с анксиолитическим действием миансерин, антагонист серотониновых 5-HT2 рецепторов, хотя и не устранял сформированную при хроническом введении этанола двигательную сенсибилизацию, но блокировал её развитие и экспрессию у мышей [9].

В настоящее время имеются многочисленные данные об экспрессии BDNF и TrkB-рецепторов до, во время и после воздействия этанола при относительно небольшом числе исследований о прямом влиянии этанола на передачу пострецепторных сигналов BDNF. Так, этанол увеличивает активность внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (extracellular signal-regulated kinase, ERK) в кортикальных нейронах при хроническом действии [19], а при остром введении, наоборот, снижает активацию ERK сигнального каскада [19–21]. Этанол угнетает передачу сигналов TrkB – ERK в гранулярных клетках мозжечка, структуре мозга, отвечающей за координацию движения и равновесие у млекопитающих [22, 23], которое не связано со снижением фосфорилирования TrkB-рецепторов [23]. Фармакологический анализ взаимодействия TrkB и этанола в клетках мозжечка показал, что вызываемое этанолом ингибирование BDNF-опосредованного фосфорилирования ERK зависит от концентрации BDNF [24]. По-видимому, региональные различия в активации и ингибировании BDNF-регулируемых сигнальных путей могут зависеть от локальной концентрации BDNF, неодинаковой чувствительности популяции нейронов к этанолу, состояния развития клетки, продолжительности воздействия этанола и от компенсаторной регуляции путей. Расторможенность нейрональных путей может также приводить к кажущейся парадоксальной активации этанолом сигнальных путей BDNF в определённых популяциях нейронов *in vivo*. Полученные в этой работе данные позволяют предположить, что ГТС-201 как низкомолекулярный миметик BDNF, преимущественно инициирующий MAPK/ERK сигнальный путь, при остром введении проникает через гематоэнцефалический барьер, компенсирует дефицит нейротрофина и, следовательно, предотвращает обусловленное острым действием этанола снижение активации пострецепторного ERK-сигнального каскада у мышей C57Bl/6, однако эта гипотеза требует дальнейшего подтверждения в опытах *in vitro*.

Выводы / Conclusions

1. При однократном введении ГТС-201 в эффективной дозе не изменяет спонтанную двигательную активность, однако при предварительном введении препятствует развитию этанол-индуцированной седативной реакции у мышей линии C57Bl/6.

2. При субхроническом введении ГТС-201 в эффективной дозе не вызывает двигательной (поведенческой) сенсибилизации, характерной для психоактивных веществ с аддиктивным потенциалом, а при совместном введении с этанолом не влияет на характер развития поведенческой сенсибилизации, вызываемой этанолом у мышей DBA/2.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Надорова Анна Владимировна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: av-nadorova@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0463-2190
н. с. лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Nadorova Anna V.
Corresponding author
e-mail: av-nadorova@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0463-2190
Research scientist, Laboratory of Pharmacological Regulation of Alcohol and Drug Addiction FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Григоревских Екатерина Михайловна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4290-4396
н. с. лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Тарасюк Алексей Валерьевич
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9750-4157
н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Сазонова Нелля Михайловна
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7608-7419
к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Колик Лариса Геннадьевна
e-mail: lgkolik@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9847-8058
SPIN-код: 9126-6922
д. б. н., профессор РАН, руководитель лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Российская Федерация

Grigorevskikh Ekaterina M.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4290-4396
Research scientist, laboratory of pharmacological regulation of alcohol and drug addiction FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Tarasiuk Aleksey V.
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9750-4157
Research scientist, Laboratory of Peptide Bioregulators of Medicinal Chemistry Department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Sazonova Nellya M.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7608-7419
PhD, Cand. Chemistry Sci., senior research scientist, laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Kolik Larisa G.
e-mail: lgkolik@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9847-8058
SPIN code: 9126-6922
Dr. Sci. (Biol.), professor RAS, Head laboratory of pharmacological regulation of alcohol and drug addiction FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Al-Qerem W, Jarrar YB, Al-Sheikh I, El Maadani A. The prevalence of drug-drug interactions and polypharmacy among elderly patients in Jordan. *Biomed Res*. 2018;29(12):2561–2569. DOI: 10.4066/biomedicalresearch.29-18-618.

2. Hakkarainen KM, Hedna K, Petzold M, Hagg S. Percentage of patients with preventable adverse drug reactions and preventability of adverse drug reactions – a meta-analysis. *PLoS One*. 2012 Mar;7(3):e33236. DOI: 10.1371/journal.pone.0033236.

3. Pozniak V, Rekve D, editors. Global Strategy to Reduce Harmful Use of Alcohol. WHO; Geneve, Switzerland: 2010. [(accessed on 20 February 2020)]. pp. 1–44. WHO Reports.

4. Chan LN, Anderson GD. Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions with ethanol (alcohol). *Clin Pharmacokinet*. 2014 Dec;53(12):1115–1136. DOI: 10.1007/s40262-014-0190-x.

5. Aucamp AK, Weis OF, Müller FO, Gill CE, Malan J. Oxprenolol plus ethanol causes no central nervous system depression--a comparison with lorazepam plus ethanol. *S Afr Med J*. 1984 Sep 22;66(12):445–446.

6. Aranko K, Seppälä T, Pellinen J, Mattila MJ. Interaction of diazepam or lorazepam with alcohol. Psychomotor effects and bioassayed serum levels after single and repeated doses. *Eur J Clin Pharmacol*. 1985;28(5):559–565. DOI: 10.1007/BF00544067.

7. Abrahao KP, Quadros IM, Souza-Formigoni ML. Individual differences to repeated ethanol administration may predict locomotor response to other drugs, and vice versa. *Behav Brain Res*. 2009 Feb 11;197(2):404–410. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.10.009.

8. Pietrzak B, Czarnecka E. Interaction between ethanol and diazepam in mice: chronobiological aspects. *Pharmazie*. 2005 Oct;60(10):761–764.

9. Ferraz IC, Boerngen-Lacerda R. Serotonin 5-HT2 receptor antagonist does not reverse established ethanolinduced sensitization but blocks its development and expression. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008 Feb;88(4):456–464. DOI: 10.1016/j.pbb.2007.10.002.

10. Demarest K, Hitzemann B, Mahjubi E, McCaughran J Jr, Hitzemann R. Further evidence that the central nucleus of the amygdala is associated with the ethanolinduced locomotor response. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998 Oct;22(7):1531–1537.

11. Hitzemann B, Hitzemann R. Chlordiazepoxide-induced expression of c-Fos in the central extended amygdala and other brain regions of the C57BL/6J and DBA/2J inbred mouse strains: relationships to mechanisms of ethanol action. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 Jul;23(7):1158–1172.

12. Botia B, Legastelois R, Houchi H, Naassila M. Basal anxiety negatively correlates with vulnerability to ethanol-induced behavioral sensitization in DBA/2J mice: modulation by diazepam. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 Jan;39(1):45–54. DOI: 10.1111/acer.12595.

13. Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Шумский А.Н., Поварнина П.Ю., Круглов С.В., Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Синтез и биологические свойства нового дипептидного миметика 2-й петли мозгового нейротрофического фактора. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(9):14–21. [Sazonova NM, Tarasyuk AV, Shumskii AN, Povarnina PYu, Kruglov SV, Antipova TA, Gudasheva TA, Seredenin SB. Synthesis and biological properties of a new dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor loop 2. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(9):763–770. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s11094-018-1896-0.

14. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В., Антипова Т.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. Дипептидные миметики отдельных петель NGF И BDNF активируют PLC-γ1. *Доклады Российской акаде-*

мии наук. Науки о жизни. 2020;494(1):486–490. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Nikolaev SV, Antipova TA, Povarnina PYu, Seredenin SB. Dipeptide mimetics of different NGF and BDNF loops activate PLC-γ1. *Dokl Biochem Biophys.* 2020;494(1):244–247. (In Russ).]. DOI: 10.1134/S1607672920050075.

15. Колик Л.Г., Надорова А.В., Григоревских Е.М., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Экспериментальное изучение анксиолитической активности низкомолекулярных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2020;83(11):3–7. [Kolik LG, Nadorova AV, Grigorevskikh EM, Gudasheva TA, Seredenin SB. Experimental study of the anxiolytic activity of low-molecular-mass mimetics of the first, second and fourth loops of brain derived neurotrophic factor. *Eksp Klin Farmakol.* 2020;83(11):3–7 (In Russ).]. DOI:10.30906/0869-2092-2020-83-11-3-7.

16. Колик Л.Г., Надорова А.В., Григоревских Е.М., Сазонова Н.М., Гудашева Т.А., Дурнев А.Д. Низкомолекулярный миметик 2-й петли BDNF снижает потребление этанола у самок крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2021;171(4):448–452. [Kolik LG, Nadorova AV, Grigorevskikh EM, Sazonova NM, Gudasheva TA, Durnev AD. Low-Molecular-Weight Mimetic of BDNF Loop 2 Reduces Ethanol Consumption in Female Rats. *Bull Exp Biol Med.* 2021 Aug;171(4):441–444. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-021-05245-w.

17. Колик Л.Г., Надорова А.В., Вальдман Е.А., Середенин С.Б. Особенности действия производных аминоадамантана на этанол-индуцированную атаксию, седацию и гиперлокомоторную реакцию у мышей. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2016;79(10):8–12. [Kolik LG, Nadorova AV, Val'dman EA, Seredenin SB. Peculiarities of the effect of aminoadamantane derivatives on ethanolinduced ataxia, sedation, and hyperlocomotion in mice. *Eksp Klin Farmakol.* 2016;79(10):8–12. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2016-79-10-8-12.

18. Колик Л.Г., Надорова А.В., Середенин С.Б. Селанк ослабляет индуцированную этанолом гиперлокомоторную реакцию и проявление поведенческой сенсибилизации у мышей линии DBA/2. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2016;162(7):67–71. [Kolik LG, Nadorova AV, Seredenin SB. Selank inhibits ethanol-induced hyperlocomotion and manifestation of behavioral sensitization in DBA/2 mice. *Bull Exp Biol Med.* 2016;162(1): 56–59. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-016-3544-6.

19. Kalluri HS, Ticku MK. Regulation of ERK phosphorylation by ethanol in fetal cortical neurons. *Neurochem Res.* 2003 May;28(5):765–769. DOI: 10.1023/a:1022822119560.

20. Chandler LJ, Sutton G. Acute ethanol inhibits extracellular signal-regulated kinase, protein kinase B, and adenosine 3′:5′-cyclic monophosphate response element binding protein activity in an age- and brain region-specific manner. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005 Apr;29(4):672–682. DOI: 10.1097/01.alc.0000158935.53360.5f.

21. Kalluri HS, Ticku MK. Ethanol-mediated inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in mouse brain. *Eur J Pharmacol.* 2002 Mar 29;439(1-3):53–58. DOI: 10.1016/s0014-2999(01)01599-0.

22. Fattori V, Abe SI, Kobayashi K, Costa LG, Tsuji R. Effects of postnatal ethanol exposure on neurotrophic factors and signal transduction pathways in rat brain. *J Appl Toxicol.* 2008 Apr;28(3):370–376. DOI: 10.1002/jat.1288.

23. Li Z, Ding M, Thiele CJ, Luo J. Ethanol inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated intracellular signaling and activator protein-1 activation in cerebellar granule neurons. *Neuroscience.* 2004;126(1):149–162. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.03.028.

24. Ohrtman JD, Stancik EK, Lovinger DM, Davis MI. Ethanol inhibits brain-derived neurotrophic factor stimulation of extracellular signal-regulated/mitogen-activated protein kinase in cerebellar granule cells. *Alcohol.* 2006 May;39(1):29–37. DOI: 10.1016/j.alcohol.2006.06.011.

Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности препарата Телзап® по сравнению с препаратом Микардис® у здоровых добровольцев после однократного приёма

Хохлов А. Л.[1], Хохлов А. А.[2], Мирошников А. Е.[3], Лебедева О. В.[4], Гребенкин Д. Ю.[5]

[1] – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», Ярославль, Российская Федерация
[2] – ООО «АХ СТ», Ярославль, Российская Федерация
[3] – ООО «КлинФармИнвест», Ярославль, Российская Федерация
[4] – Представительство АО «Санофи-авентис груп» (Франция), Москва, Российская Федерация
[5] – ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность.* Телмисартан широко используется в клинической практике при терапии артериальной гипертензии. Он является специфическим антагонистом рецепторов ангиотензина II (тип AT1) и эффективен при приёме внутрь. В рамках регистрации препарата Телзап® было проведено исследование его биоэквивалентности с препаратом Микардис® с участием 60 здоровых добровольцев. *Цель.* Целью настоящего исследования являлось сравнительное изучение фармакокинетики и подтверждение биоэквивалентности двух препаратов — Микардис® (телмисартан, таблетки, 80 мг, компании Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ, Германия) и Телзап® (телмисартан, таблетки, 80 мг, компании Зентива к.с., Чешская Республика) у здоровых добровольцев после однократного приёма натощак. *Материалы и методы.* Для подтверждения биоэквивалентности было проведено открытое, сравнительное, рандомизированное, одноцентровое, перекрёстное, повторное клиническое исследование с четырьмя этапами. В ходе исследования у добровольцев отбирались образцы плазмы крови, в которых при помощи валидированной ВЭЖХ-МС/МС методики определялись концентрации телмисартана. На основании полученных данных был проведён фармакокинетический и статистический анализ и рассчитаны доверительные интервалы (ДИ) для фармакокинетических параметров C_{max} и AUC_{0-72}. *Результаты и обсуждение.* На основании результатов статистического анализа было показано, что фармакокинетические параметры тестируемого и референтного препарата характеризуются высоким сходством. Для оцениваемых фармакокинетических параметров телмисартана 90 % ДИ находились в пределах 80–125 % для AUC_{0-72}, и для C_{max} в пределах 73,07–136,85 %. *Заключение.* Таким образом, согласно применяемым критериям, препараты признаны биоэквивалентными..

Ключевые слова: телмисартан; фармакокинетика; биоэквивалентность

Для цитирования:
Хохлов А. Л., Хохлов А. А., Мирошников А. Е., Лебедева О. В., Гребенкин Д. Ю. Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности препарата Телзап® по сравнению с препаратом Микардис® у здоровых добровольцев после однократного приёма. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(4):62–68. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-62-68
Поступила: 07 декабря 2022 г. **Принята:** 19 декабря 2022 г. **Опубликована:** 24 декабря 2022 г.

Pharmacokinetic and bioequivalence study of Telzap® in comparison with Mikardis® in healthy subjects after single administrationl

Khokhlov AL[1], Khokhlov AA[2], Miroshnikov AE[3], Lebedeva OV[4], Grebenkin DYu[5]
[1] – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Yaroslavl State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Yaroslavl, Russian Federation
[2] – LLC "AX CT", Yaroslavl, Russian Federation
[3] – LLC ClinPharmInvest, Yaroslavl, Russian Federation
[4] – Representative office of Sanofi-aventis group JSC (France), Moscow, Russian Federation
[5] – LLC Exacte Labs, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Introduction*. Telmisartan is widely used in clinical practice during hypertension treatment. It is a specific angiotensin II receptor antagonist (type AT1), effective at oral intake, A bioequivalence study of Telzap® and Mikardis® was conducted with 60 volunteers. *Aim*. The purpose of the bioequivalence trial was a comparative study of the pharmacokinetics and evidence of the bioequivalence of Mikardis® (telmisartan, tablets 80 mg, Boehringer Ingelheim International GmbH, Germany) and Telzap® (telmisartan, tablets 80 mg, Zentiva KS company, Czech Republic) in healthy volunteers after a single administration under fasting. *Materials and methods*. To prove bioequivalence, an open label, comparative, randomized, crossover four-period replicate single-center clinical trial was conducted. The concentrations of telmisartan in plasma samples were determined by a validated HPLC-MS/MS method. A pharmacokinetic and statistical analysis was performed and confidence intervals for the pharmacokinetic parameters C_{max} and AUC_{0-72} were calculated. *Results and discussion*. It can be concluded that the studied formulations are bioequivalent in terms of pharmacokinetic parameters of test and reference drug. All 90 % confidence intervals of were within the bioequivalence range of 80–125 % for AUC_{0-72} and 73,07–136,85 % for C_{max}. *Conclusion*. Thus, according to the criteria used in the study, the formulations are proved to be bioequivalent.

Keywords: telmisartan; pharmacokinetics; bioequivalence

For citations:
Khokhlov AL, Khokhlov AA, Miroshnikov AE, Lebedeva OV, Grebenkin DYu. Pharmacokinetic and bioequivalence study of Telzap® in comparison with Mikardis® in healthy subjects after single administration. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(4):62–68. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-62-68
Received: December 07, 2022. **Accepted:** December 19, 2022. **Published:** December 24, 2022

Введение / Introduction

На сегодняшний день артериальная гипертензия (АГ) является одним из важнейших факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, таких как инфаркт миокарда, инсульт, сердечная и почечная недостаточность [1]. В настоящее время доказана польза от снижения артериального давления (АД) [2, 3].

Блокаторы рецепторов ангиотензина-II (БРА) являются одним из основных классов лекарственных препаратов, широко применяемых в кардиологии при терапии АГ [4]. Телмисартан является современным и эффективным антигипертензивным препаратом, который имеет ряд преимуществ по сравнению с другими препаратами группы БРА [5]. Телмисартан обладает высокой биодоступностью и продолжительным временем полувыведения (более 24 ч), что особо важно для контроля артериального давления в опасные утренние часы. Телмисартан выводится почками менее 2 %, благодаря чему его применение безопасно у больных с патологией почек [6].

Нужно отметить, телмисартан обладает наибольшим сродством к PPARg-рецепторам, что особенно важно при выборе гипотензивной терапии у пациентов с метаболическими нарушениями, инсулинорезистентностью, нефропатией [7].

По данным статистики ежегодно на фармацевтическом рынке фиксируется значительное увеличение количества воспроизведённых лекарственных препаратов (дженериков) [8]. Любые отклонения при производстве дженериков могут существенно отразиться на их безопасности, эффективности и качестве. Поэтому для принятия решения об их взаимозаменяемости с референтными лекарственными препаратами, необходимо проведение качественных исследований по оценке их биоэквивалентности, что в свою очередь, является обязательным условием для регистрации воспроизведённого препарата.

В данной статье представлены результаты исследования биоэквивалентности препарата Телзап® (производитель Зентива к.с., Чешская Республика) по сравнению с Микардис® (производитель Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ, Германия).

Материалы и методы / Materials and methods

Этические принципы

Данное исследование проводилось в соответствии с протоколом, принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, стандартами по Надлежащей Клинической Практике (ICH GCP), а также в соответствии с другими законодательствами. Участие в исследовании являлось добровольным. Доброволец имел право отказаться от участия в проводимом исследовании на любой его стадии. Этическую экспертизу клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов проводил Совет по этике при Министерстве здравоохранения и Локальный этический комитет (ЛЭК). Одобрение окончательной версии Протокола 2.1 состоялось 17 июля 2014 г. Разрешение на проведение клинического исследования было выдано Министерством здравоохранения РФ №415 от 23 июля 2014 года по результатам экспертизы документов, необходимых для получения разрешения на проведение исследования, и этической экспертизы, проводимых в порядке, установленном статьёй 20 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Все одобренные документы были получены до выполнения добровольцами каких-либо процедур исследования, включая тесты скрининга для оценки пригодности.

Дизайн исследования

Данное исследование биоэквивалентности являлось открытым, сравнительным, рандомизированным, одноцентровым, перекрёстным повторным клиническим исследованием с четырьмя периодами по оценке биоэквивалентности препаратов Микардис® (телмисартан, таблетки 80 мг) и Телзап® (телмисартан, таблетки 80 мг) при однократном повторном приёме внутрь здоровыми добровольцами одной дозы каждого из них натощак.

Всего было отобрано 99 человек, 60 добровольцев было включено в исследование; 7 человек приняли участие в исследовании в качестве дублеров, из них 3 было рандомизировано, взамен выбывших участников исследования до процедуры дозинга.

В первом периоде препарат приняли 60 человек, во втором – 59 человек, в третьем и четвертом – 58 человек.

Средний возраст включённых в исследование добровольцев и дублёров составил 25,7 лет, рост – 169,4 см, масса тела – 69,2 кг, средний индекс массы тела – 23,0 кг/м^2.

Все добровольцы были разделены на 2 группы: А и Б. Каждый доброволец был отнесён к одной из групп с определённой последовательностью приёма препаратов: RTRT или TRTR. Добровольцы, включённые в группу А, в первом и третьем периоде исследования получали исследуемый препарат (T), а представители группы Б – препарат сравнения (R).

Во втором и четвёртом периодах исследования назначение препарата было обратным: представители группы А получали препарат сравнения (R), а представители группы Б – исследуемый препарат (T). Это означало, что группа А получала лекарственный препарат в последовательности TRTR, а группа Б получала лекарственный препарат в последовательности RTRT. Таким образом, общая схема исследования была «TRTR | RTRT».

По причине вместимости клинического центра добровольцы были разделены на 2 подгруппы по 30 человек. Добровольцы каждой подгруппы находились в том же клиническом центре, следовали одинаковым процедурам и требованиям протокола. Получение

препарата и манипуляции с кровью проводились в одинаковых условиях (включая, но не ограничиваясь использованием одинакового типа и производства внутривенных катетеров, игл, одинаковых систем дезинфекции, типов лабораторных и транспортных пробирок, морозильных камер и т. д.).

Все добровольцы из обеих подгрупп получали одинаковую пищу в каждом из периодов госпитализации, соблюдался единый интервал времени между периодами (период «отмывания»).

Исследуемые препараты

Действующим веществом исследуемого препарата и препарата сравнения является телмисартан. В качестве препарата сравнения (референтный, R) использовался:

– Микардис® (телмисартан, таблетки 80 мг, Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ, Германия, номер серии 301507).

В качестве исследуемого препарата (тест, T) использовался:

– Телзап® (телмисартан, таблетки 80 мг, Зентива к.с., Чешская Республика, номер серии 089093).

Введение препарата и отбор образцов

В соответствии с законодательной и нормативной базой исследование было выполнено с предоставленными Спонсором образцами исследуемого препарата и препарата сравнения. Исследуемый препарат применялся внутрь, в дозе 80 мг, препарат сравнения – в аналогичной дозе (1 таблетка). Доброволец запивал таблетки 200 мл воды.

Образцы крови отбирались с помощью катетера, установленного в вену предплечья в течение 16 часов после приёма препарата. Начиная со второго взятия крови, перед каждой точкой забора крови из катетера 1 мл крови удалялся для исключения попадания гепарина в образец крови. После каждого забора крови из катетера он промывался 0,5 мл гепаринизированного физиологического раствора (500 МЕ на 100 мл 0,9 % натрия хлорида) во избежание его тромбирования. Катетер был удален после взятия образцов крови через 16 часов после приёма препарата. Образцы крови в точке 24, 48 и 72 часа отбирались путём прямой венепункции. Отбор образцов крови осуществлялся в вакуумные пробирки (вакутейнеры) объёмом 4 мл, содержащие К2ЭДТА в качестве антикоагулянта.

В каждую вакуумную пробирку отбиралось 4 мл крови, пробирки перемешивались, через 30 минут центрифугировались при охлаждении. Плазму из супернатанта переносили в две предварительно промаркированные криопробирки (аналитическая (A) и архивная аликвоты (B)), объём аналитической аликвоты составлял не менее 1,5 мл. После переноса плазмы в криопробирки её незамедлительно замораживали на сухом льду. В дальнейшем образцы хранились при температуре ≤ –20 °C. Индивидуальные комплекты хранились в разных морозильных камерах. Таким образом, до отправки все образцы хранились в клиническом центре в морозильной камере с контролируемой температурой ≤ –20 °C.

Анализ концентрации телмисартана был выполнен в 23 образцах плазмы крови, взятых у всех добровольцев в течение четырёх периодов исследования в следующих временных точках: 0 (до приёма препарата) и через 0:10, 0:20, 0:30, 0:40, 0:50, 1:00, 1:15, 1:30, 1:45, 2:00, 2:30, 3:00, 4:00, 6:00, 8:00, 10:00, 12:00, 16:00, 24:00; 36:00, 48:00 и 72:00 часов после приёма препарата.

Подробности приведены в разделе *Результаты и обсуждение*.

Анализ концентрации действующих веществ в образцах

Для определения концентраций телмисартана в 5379 образцах, полученных в клинической части исследования, была использована ВЭЖХ-МС/МС методика, валидированная в соответствии с руководствами [9, 10]. В качестве внутреннего стандарта использовался изотопномеченный (дейтерированный) телмисартан.

Аналитические серии по каждому добровольцу состояли из 56 образцов: 1 образец пустой плазмы крови (бланк), 8 калибровочных образцов, 6 образцов контроля качества и 4×23 образцов исследования. Аналитическая методика предполагала использование 50 мкл образца для каждого анализа. Аналитический диапазон методики составил 2,0–1200,0 нг/мл телмисартана в плазме. Подготовка проб осуществлялась методом депротеинизации (осаждения белков). Полученные депротеинизаты были проанализированы на ВЭЖХ-системе Thermo Scientific Transcend с МС/МС-детектором TSQ-12.

Персонал, участвующий в выполнении биоаналитического анализа, не был проинформирован о схеме рандомизации и не обладал информацией о последовательности приёма исследуемого препарата и препарата сравнения.

Результаты и обсуждение / Results and Discussion

Участники исследования и безопасность

С момента подписания информированных согласий до окончания наблюдения за добровольцами было выявлено 72 нежелательных явлений (НЯ) с лёгкой степенью тяжести, 1 нежелательное явление – со средней степенью тяжести (закрытая травма правого голеностопного сустава, произошедшая между третьей и четвертой госпитализацией) у добровольца во время тренировки в спортзале.

Соотношение частоты развития НЯ составило: 25 – после приёма исследуемого препарата, 28 – после приёма референтного препарата, 20 – не были связаны с приёмами препаратов. Во всех случаях связь с приёмом препарата, оценённая как Определённая,

Возможная и Вероятная, была обусловлена основным действием препарата (брадикардия и гипотония) или нахождением в закрытом ограниченном пространстве. В остальных случаях возникновения НЯ связь с приёмом препарата была оценена как Сомнительная.

Все нежелательные явления полностью завершились до завершения исследования. Серьёзных нежелательных явлений выявлено не было.

Фармакокинетические параметры и оценка биоэквивалентности

Фармакокинетические параметры телмисартана

Средние значения основного параметра, характеризующего биодоступность действующего вещества из лекарственной формы – площади под фармакокинетической кривой, AUC_{0-72} – для исследуемого и референтного препаратов (M±SD), составили 1508,1±1025,01 нг·ч/мл (диапазон от 262,2 до 5469 нг/мл) и 1532,8±1020,1 нг·ч/мл (диапазон от 224,6 до 5318 нг·ч/мл), соответственно, и представлены на рис. 1.

Средние значения максимальных концентраций телмисартана (C_{max}), определяемых в плазме крови добровольцев при приёме исследуемого препарата (M±SD) составили 372,9±241,2 нг/мл (диапазон от 51,2 до 1269 нг/мл), для референтного – 394,7±291,6 нг/мл (диапазон от 52,1 до 1838 нг/мл).

Медианы времени достижения максимальной концентрации (T_{max}) для исследуемого и референтного препарата были равны 0,94 ч и 1,00 ч, соответственно. Средние значения данного показателя (M ± SD) составили 0,94±0,49 ч и 1,00±0,51 ч для исследуемого и референтного препаратов, соответственно. Различия между препаратами по параметру Tmax являются статистически значимыми ($p < 0,05$, медианный тест, тест Краскела–Уоллиса). Для исследуемого и референтного препаратов получены следующие значения показателей: $T_{1/2}$ – 27,76±16,72 ч и 27,86±16,81 ч, соответственно, λ_z – 0,03420 ± 0,02481 $ч^{-1}$ и 0,03349 ± ± 0,02472 $ч^{-1}$, соответственно. Данные представлены в табл. 1.

Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров AUC_{0-72} (T) / AUC_{0-72} (R), характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референтному, составило 98,39 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров C_{max} (T) / C_{max} (R), характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 94,48 %.

Оценка биоэквивалентности

Биоэквивалентность исследуемого и референтного препаратов оценивали на основании 90 % ДИ значений AUC_{0-72} и C_{max} телмисартана как основных параметров. Согласно протоколу, препараты считались биоэквивалентными, если границы оцененного ДИ для AUC_{0-72} и C_{max} находились в пределах 80,00–125,00 % (при подтверждении, что вариабельность C_{max} телмисартана референтного препарата составляет более 30 %,

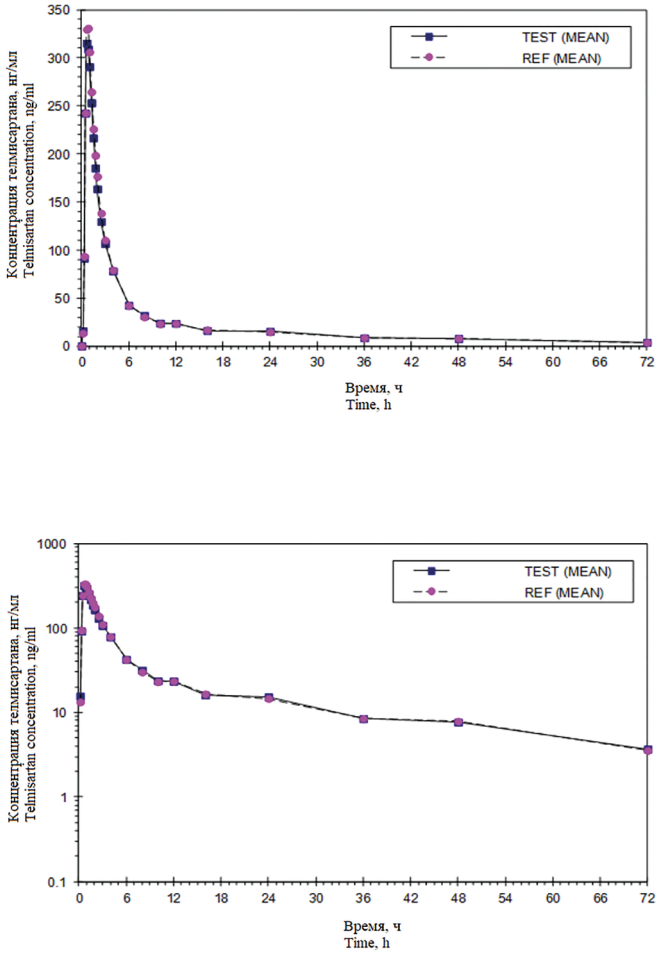


Рис. 1. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили телмисартана в плазме крови добровольцев после двухкратного дозирования исследуемого препарата Телзап® (телмисартан, таблетки 80 мг, Зентива к.с., Чешская Республика) в сравнении с приёмом референтного препарата Микардис® (телмисартан, таблетки 80 мг, Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ, Германия). Полулогарифмическая (снизу) и линейная (сверху) шкалы. TEST – исследуемый (тестируемый) препарат, REF – препарат сравнения (референтный).
Fig. 1. Average pharmacokinetic profiles of telmisartan in blood plasma after a double administration under fasting of Telzap® (telmisartan, tablets, 80 mg, Zentiva KS company, Czech Republic) and Mikardis® (telmisartan, tablets 80 mg, Boehringer Ingelheim International GmbH, Germany). Semilogarithmic (bottom) and linear (top) scales. TEST – test formulation, REF – reference formulation
Источник: Хохлов А.Л. и соавт., 2022
Source: Khokhlov AL et al., 2022

границы 90 % ДИ для данного фармакокинетического параметра могли быть увеличены в соответствии с протоколом).

Для телмисартана точечная оценка индивидуальных отношений AUC_{0-72} (T) / AUC_{0-72} (R) составила 98,38 %, 90 % ДИ: 94,66–102,24 %, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00 %). Точечная оценка индивидуальных отношений C_{max} (T) / C_{max} (R)

Таблица 1

Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров телмисартана (N – число измерений, CV – коэффициент вариации)

Table 1

Summary average pharmacokinetic parameters of telmisartan (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	N	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T)		Референтный препарат (R) Reference formulation (R)		Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)
		Среднее Average	КВ, (%) CV, (%)	Среднее Average	КВ, (%) CV, (%)	
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	117	372,9	64,69	394,7	73,87	94,48
t_{max}, ч t_{max}, h	117	0,94	52,46	1,00	51,30	94,84
AUC_{0-72}, нг·ч/мл AUC_{0-72}, ng·h/ml	117	1508,1	67,97	1532,8	66,55	98,39
λ_z, $ч^{-1}$ λ_z, h^{-1}	117	0,03420	72,55	0,03349	73,82	102,11
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	117	27,76	60,25	27,86	60,33	99,66

Таблица 2

ДИ для отношений фармакокинетических параметров C_{max} и AUC_{0-72} телмисартана (N – число измерений, CV – коэффициент вариации, T – исследуемый препарат, R – препарат сравнения)

Table 2

CI for C_{max} and AUC_{0-72} ratios telmisartan (N – number of observations, CV – coefficient of variation, T – test formulation, R – reference formulation)

Параметр Parameter	Средние геометрические Geometric mean				Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)	90% ДИ, (%) 90% CI, (%)		БЭ BE	CV, (%)
	N	T	N	R		Нижний Lower	Верхний Upper		
AUC_{0-72}, нг·ч/мл AUC_{0-72}, ng·h/ml	117	1236,6	117	1257,0	98,38	94,66	102,24	ДА1 Yes1	17,95
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	117	298,8	117	308,2	96,97	89,25	105,36	ДА2 Yes2	39,83

Примечания: [1]Границы ДИ: 80,00–125,00 %; [2]Границы ДИ: 73,07–136,85 %, так как CV_{intra} для референтного препарата составило 43,10 %.
Notes: [1]CI range: 80,00–125,00 %; [2]CI range: 76,73–130,32 %, because CV_{intra} of reference formulation is 35,93 %.

составила 96,97 %, 90 % ДИ: 89,25–105,36 %, что находится в рамках допустимого расширенного диапазона (73,07–136,85 %). Диапазон был расширен на основании полученных в исследовании данных о высокой внутрисубъектной вариабельности параметра C_{max} для референтного лекарственного препарата: значение CV_{intra} для него составило 43,10 % (более 30 %), в соответствии с этой величиной рассчитан допустимый расширенный диапазон ДИ (табл. 2). Данный подход описан Руководством по экспертизе лекарственных средств, Том 1 [9], руководством ЕАЭС [10].

Результаты исследования биоэквивалентности послужили основанием для регистрации препарата Телзап® (телмисартан, таблетки 80 мг, Зентива к.с., Чешская Республика) под номером ЛП-003545.

Заключение / Conclusion

В рамках регистрации препарата Телзап® было проведено исследование его биоэквивалентности относительно препарата Микардис® при однократном приёме здоровыми добровольцами натощак. На основании полученных данных можно констатировать, что исследуемые препараты характеризуются высокой степенью сходства показателей фармакокинетики. Индивидуальные и усреднённые профили фармакокинетических кривых исследуемого и референтного препаратов телмисартана имеют совпадающие формы. Исследуемые препараты характеризуются близкими значениями относительной биодоступности телмисартана и максимальной концентрацией телмисартана. Доверительный интервал для отношений средних

геометрических значений оцениваемых показателей телмисартана исследуемого и референтного препаратов полностью соответствуют установленным пределам.

Таким образом, выполненное исследование позволяет констатировать биоэквивалентность препарата Телзап® (телмисартан, таблетки 80 мг, Зентива к.с., Чешская Республика) относительно препарата Микардис® (телмисартан, таблетки 80 мг, Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ, Германия).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. *Лебедева О. В.* управляла всеми этапами исследования биоэквивалентности со стороны Спонсора, *Хохлов А. Л.*, *Хохлов А. А.*, *Мирошников А. Е.* руководили клиническим этапом исследования, *Гребенкин Д. Ю.* участвовал в оформлении рукописи.

Contribution of the authors. *Lebedeva OV* managed all stages of the bioequivalence study from the Sponsor side; *Khokhlov AL*, *Khokhlov AA*, *Miroshnikov AE* were responsible for the clinical phase of the study; *Grebenkin DYu* wrote the text of the manuscript.

Конфликт интересов. Исследование спонсировалось АО «Санофи-авентис груп», *Лебедева О. В.* является сотрудником данной компании; *Хохлов А. А.* является сотрудником ООО «АХ СТ». *Мирошников А. Е.* является сотрудником ООО «КлинФармИнвест», выполнявший данное контрактное исследование для АО «Санофи-авентис груп»; *Хохлов А. Л.*, *Гребенкин Д. Ю.* заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The study was sponsored by Sanofi *Lebedeva OV* is an employee of this company; *Khokhlov AA* is an employee of LLC "AH ST". *Miroshnikov AE* is an employee of KlinFarmInvest LLC, who performed this contract research for Sanofi; *Khokhlov AL*, *Grebenkin DYu* declare that there is no conflict of interest.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Хохлов Александр Леонидович
e-mail: al460935@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0032-0341
SPIN-код: 9389-8926
д. м. н., проф., академик РАН, зав. кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, ректор ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ярославль, Российская Федерация; Председатель Совета по этике при Министерстве здравоохранения РФ, Ярославль, Российская Федерация

Khokhlov Alexander L.
e-mail: al460935@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0032-0341
SPIN code: 9389-8926
Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Head Chair of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Rector of Yaroslavl State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Yaroslavl, Russian Federation; Chairman of the Ethics Council under the Ministry of Health of the Russian Federation, Yaroslavl, Russian Federation

Хохлов Александр Александрович
e-mail: aa_khokhlov@cphinvest.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-3307-0705
к. м. н., менеджер по клиническим исследованиям ООО «АХ СТ», Ярославль, Российская Федерация

Khokhlov Alexander A.
e-mail: aa_khokhlov@cphinvest.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-3307-0705
PhD, Cand. Sci. Med., clinical trials manager LLC «AH ST», Yaroslavl, Russian Federation

Мирошников Алексей Евгеньевич
e-mail: ae_miroshnikov@cphinvest.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6657-3950
SPIN-код: 8896-8993
к. м. н., ООО «КлинФармИнвест», Ярославль, Российская Федерация

Miroshnikov Alexei E.
e-mail: ae_miroshnikov@cphinvest.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6657-3950
SPIN code: 8896-8993
PhD, Cand. Sci. Med., LLC ClinPharmInvest, Yaroslavl, Russian Federation

Лебедева Ольга Владимировна
e-mail: Olga.Lebedeva@sanofi.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7983-685X
PhD, руководитель клинических проектов, Представительство АО «Санофи-авентис груп» (Франция), Москва, Российская Федерация

Lebedeva Olga V.
e-mail: Olga.Lebedeva@sanofi.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7983-685X
PhD, clinical project leader, Representative office of Sanofi (France), Moscow, Russian Federation

Гребенкин Дмитрий Юрьевич
Автор, ответственный за переписку
e-mail: dmitrii.grebenkin@exactelabs.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9304-8000
к. фарм. н., руководитель лаборатории фарманализа, ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Российская Федерация

Grebenkin Dmitry Yu.
Corresponding author
e-mail: dmitrii.grebenkin@exactelabs.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9304-8000
PhD, Cand. Pharm Sci., Head of the farmanalysis laboratory, Exacte Labs LLC, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Максимов М.Л., Дралова О.В. Блокатор рецепторов ангиотензина телмисартан: эффективность, безопасность и актуальность клинического применения // *Системные гипертензии*. 2017. Т. 14. № 1. С. 51–57. [Maksimov ML, Dralova OV. Angiotensin receptor blocker telmisartan: efficacy, safety and relevance of clinical application. Systemic Hypertension. 2017;14(1):51–57. (In Russ).]. DOI:10.26442/2075-082x_14.1.51-57

2. Шальнова С.А., Деев А.Д., Баланова Ю.А. и др. Лечение гипертонии у пациентов высокого риска. Монотерапия или комбинация? // *Лечащий врач*. 2016. № 7. С. 17–17. [Shalnova SA, Deev AD, Balanova YuA. Lechenie gipertonii u patsientov vysokogo riska. Monoterapiya ili kombinatsiya? *Lechashchii vrach*. 2016;(7):17–17. (In Russ).]

3. ESH/ESC Guidelines for the management of arterial Hypertension. *J Hypertension*. 2013; 31(7):1281–357.

4. Чазова И.Е., Ратова Л.Г. Первое поколение сартанов: есть ли перспективы? // *Системные гипертензии*. 2010. №. 4. С. 5–9. [Chazova IE, Ratova LG. The first generation sartans: Is there a future? *Sistemnye Gipertenzii*. 2010;(4):5–9. (In Russ).].

5. Подзолков В.И., Тарзиманова А.И. Телмисартан в лечении артериальной гипертензии. Клинический разбор // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2012. Т. 8. № 2. С. 201–204. [Podzolkov VI, Tarzimanova AI. Telmisartan in the treatment of arterial hypertension. Case study. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2012;8(2):201–204. (In Russ).].

6. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Телмисартан. [Instruktsiya po primeneniyu lekarstvennogo preparata dlya meditsinskogo primeneniya Telmisartan. (In Russ).]. URL: http://grls.rosminzdrav.ru. Ссылка активна на 12.04.2022.

7. Wang Y., Qiao S., Han D.W, et al. Telmisartan improves insulin resistance: a meta-analysis. *American Journal of Therapeutics*. 2018;25(6): e642-e651. DOI: 10.1097/mjt.0000000000000733

8. Фармацевтичсекий рынок России. Годовой отчет 2020. DSM Group. [Farmatsevtichsekii rynok Rossii. Godovoi otchet 2020. DSM Group. (In Russ).] URL: https://dsm.ru/docs/analytics/2020_Report_rus.pdf. Ссылка активна на 21.03.2022.

9. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013; 280. [Mironov AN. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennyh sredstv. T. I. Moscow: Grif and K; 2013. (In Russ).]

10. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016. [Pravila provedeniya issledovanij bioekvivalentnosti lekarstvennyh sredstv Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza. 2016. (In Russ).].

Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности двухкомпонентного препарата Телзап® Плюс по сравнению с МикардисПлюс® с участием здоровых добровольцев после однократного приёма

Хохлов А. Л.[1], Хохлов А. А.[2], Мирошников А. Е.[3], Лебедева О. В.[4], Гребенкин Д. Ю.[5]

[1] – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», Ярославль, Российская Федерация
[2] – ООО «АХ СТ», Ярославль, Российская Федерация
[3] – ООО «КлинФармИнвест», Ярославль, Российская Федерация
[4] – Представительство АО «Санофи-авентис груп» (Франция), Москва, Российская Федерация
[5] – ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность*. Комбинация телмисартана и гидрохлоротиазида показана при лечении артериальной гипертензии. Сочетание этих веществ обуславливает аддитивный эффект, который способствует снижению артериального давления (АД). В рамках регистрации комбинированного препарата Телзап® Плюс было проведено исследование его биоэкивалентности по сравнению с МикардисПлюс® с участием 63 здоровых добровольцев. *Цель*. Целью настоящего исследования являлось сравнительное изучение фармакокинетики и подтверждение биоэквивалентности двухкомпонентного препарата Телзап® Плюс (таблетки 80 мг + 12,5 мг, компания Зентива к.с., Чешская Республика) относительно препарата МикардисПлюс® (телмисартан+гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, компания Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко. КГ, Германия) у здоровых добровольцев после однократного приёма натощак. *Материалы и методы*. Для подтверждения биоэквивалентности было проведено открытое, сравнительное, рандомизированное, перекрёстное клиническое исследование с повторным дизайном в четыре этапа. В ходе исследования у добровольцев отбирались образцы плазмы крови, в которых при помощи валидированной ВЭЖХ-МС/МС методики определялись концентрации телмисартана и гидрохлоротиазида. На основании полученных данных был проведён фармакокинетический и статистический анализ и рассчитаны доверительные интервалы (ДИ) для фармакокинетических параметров C_{max} и AUC_{0-72}. *Результаты и обсуждение*. Было показано, что сравниваемые препараты биоэквивалентны по фармакокинетическим параметрам в отношении как гидрохлоротиазида, так и телмисартана. Для всех оцениваемых фармакокинетических параметров гидрохлоротиазида 90 % ДИ находились в пределах 80–125 %. В случае телмисартана 90 % ДИ для AUC_{0-72} находились в пределах 80–125 %, и для C_{max} в пределах 79,30–126,11 %. *Заключение*. Таким образом, согласно применяемым критериям, препараты признаны биоэквивалентными.

Ключевые слова: телмисартан; гидрохлоротиазид; фармакокинетика; биоэквивалентность

Для цитирования:
Хохлов А. Л., Хохлов А. А., Мирошников А. Е., Лебедева О. В., Гребенкин Д. Ю. Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности двухкомпонентного препарата Телзап® Плюс по сравнению с МикардисПлюс® с участием здоровых добровольцев после однократного приёма. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2022;(4):69–77. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-69-77
Поступила: 07 декабря 2022 г. **Принята:** 19 декабря 2022 г. **Опубликована:** 24 декабря 2022 г.

Pharmacokinetic and bioequivalence study of Telzap® Plus fixed-dose combination compared with MikardisPlus® in healthy volunteers after single administration

Khokhlov AL[1], Khokhlov AA[2], Miroshnikov AE[3], Lebedeva OV[4], Grebenkin DYu[5]

[1] – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Yaroslavl State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Yaroslavl, Russian Federation
[2] – LLC "AX CT", Yaroslavl, Russian Federation
[3] – LLC ClinPharmInvest, Yaroslavl, Russian Federation
[4] – Representative office of Sanofi-aventis group JSC (France), Moscow, Russian Federation
[5] – LLC Exacte Labs, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Introduction*. A fixed dose combination of telmisartan and hydrochlorothiazide is indicated for treatment of in the treatment of arterial hypertension. The combination of these substances causes an additive effect that helps to reduce blood pressure. A bioequivalence study of Telzap® Plus compared with MikardisPlus® was conducted with 63 volunteers. *Aim*. The purpose of the bioequivalence trial was a comparative study of the pharmacokinetics and evidence of the bioequivalence of the fixed dose combination drug product Telzap® Plus (tablets 80 mg + 12,5 mg, Zentiva KS company, Czech Republic) compared with drug products MikardisPlus® (telmisartan+hydrochlorothiazide, tablets 80 mg + 12,5 mg, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Germany) in healthy volunteers after a single administration under fasting. *Materials and methods*. To prove bioequivalence, an open label, comparative, randomized, crossover four-period replicate single-center clinical trial was conducted. The concentrations of hydrochlorothiazide and telmisartan in plasma samples were determined with a validated HPLC-MS/MS method. A pharmacokinetic and statistical analysis was performed and confidence intervals for the pharmacokinetic parameters C_{max} and AUC_{0-72} were calculated. *Results and discussion*. It can be concluded that the studied formulations are bioequivalent in terms of pharmacokinetic parameters of hydrochlorothiazide and telmisartan. All 90 % confidence intervals for the estimated pharmacokinetic parameters of hydrochlorothiazide were in the range of 80–125 %, 90 % confidence intervals for telmisartan were within the bioequivalence range of 80–125 % for AUC_{0-72}, and 79,30–126,11 % for C_{max}. *Conclusion*. Thus, according to the criteria used in the study, the formulations are proved to be bioequivalent..

Keywords: telmisartan; hydrochlorothiazide; pharmacokinetics; bioequivalence

For citations:
Khokhlov AL, Khokhlov AA, Miroshnikov AE, Lebedeva OV, Grebenkin DYu. Pharmacokinetic and bioequivalence study of Telzap® Plus fixed-dose combination compared with MikardisPlus® in healthy volunteers after single administration. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(4):69–77. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-69-77
Received: December 07, 2022. **Accepted:** December 19, 2022. **Published:** December 24, 2022.

Введение / Introduction

Одним из важнейших факторов риска развития инфаркта миокарда и инсульта головного мозга является артериальная гипертензия (АГ). Рост смертности от сердечно-сосудистых заболеваний обосновывает актуальность проблемы лечения гипертонии [1].

По итогам пересмотра Европейских рекомендаций 2018 года по диагностике и лечению АГ была подчёркнута особая важность назначения пациентам фиксированных комбинаций антигипертензивных препаратов [2]. Достоинствами фиксированных комбинаций является простота назначения доз лекарственных препаратов, уменьшение частоты нежелательных реакций, снижение стоимости лечения за счёт уменьшения количества принимаемых таблеток, увеличение приверженности пациента терапии [3].

Особое внимание заслуживает комбинация блокатора рецепторов ангиотензина II и тиазидного диуретика – телмисартана и гидрохлоротиазида, высокая антигипертензивная эффективность которой была доказана в исследовании *Neldam S.* и *Edwards C.* [4]. В рамках другого исследования [5], проведённого в условиях реальной клинической практики, телмисартан и его комбинация с гидрохлоротиазидом продемонстрировали, кроме высокой антигипертензивной эффективности, хорошую переносимость и позволили достичь целевых показателей артериального давления (АД) у большинства пациентов. Более того, совместное применение телмисартана и гидрохлоротиазида обладает значительным органопротекторным свойством, что позволяет защитить органы-мишени АГ и назначать эту комбинацию для лечения широкого круга пациентов [6].

Уникальным фармакологическим свойством телмисартана и его комбинации с гидрохлоротиазидом является благоприятное влияние на липидный и углеводный профиль, которое заключается в повышении чувствительности тканей к инсулину, снижении липопротеинов низкой плотности и общего холестерина крови, тем самым способствующее уменьшению риска развития сахарного диабета и атеросклероза [7].

Таким образом, фиксированная комбинация телмисартана с гидрохлоротиазидом является перспективной для лечения пациентов с АГ, позволяющая быстро достигать целевых показателей АД, защитить органы-мишени АГ и обеспечить длительный антигипертензивный эффект.

Лекарственный препарат Телзап® Плюс, является воспроизведённым. Высокая популярность воспроизведённых лекарственных препаратов и исследований биоэквивалентности в России и в мире объясняется тем, что зачастую стоимость воспроизведённого лекарственного средства ниже оригинального, а это обеспечивает доступ к современным препаратам широкому кругу пациентов, если говорить о дорогостоящем лечении [8]. Эквивалентность воспроизведённого препарата оригинальному доказывают в рамках исследования биоэквивалентности, в которых демонстрируется, что оба лекарственных средства имеют одинаковую скорость и степень абсорбции [9]. Такие исследования призваны подтвердить, что воспроизведённые лекарственные средства терапевтически эквивалентны референтным лекарственным средствам, то есть обладают той же эффективностью и безопасностью, что и референтный препарат.

Материалы и методы / Materials and methods

Этические принципы

Данное исследование проводилось в соответствии с протоколом, принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, стандартами по Надлежащей Клинической Практике (ICH GCP), а также в соответствии с другими законодательствами. Участие в исследовании являлось добровольным. Доброволец имел право отказаться от участия в проводимом исследовании на любой его стадии. Этическую экспертизу клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов проводил Совет по этике при Министерстве здравоохранения и Локальный этический комитет (ЛЭК). Одобрение Протокола версии 3.0 было подтверждено выпиской из протокола заседания Совета по этике №108 от 18 августа 2015 г. и письмом Министерства Здравоохранения РФ №456555-20-1 от 28.08.2015. Разрешение на проведение клинического исследования было выдано Министерством здравоохранения РФ №252 от 20 мая 2015 года по результатам экспертизы документов, необходимых для получения разрешения на проведение исследования, и этической экспертизы, проводимых в порядке, установленном статьей 20 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Все одобренные документы были получены до выполнения добровольцами каких-либо процедур исследования, включая тесты скрининга для оценки пригодности.

Дизайн исследования

Данное исследование биоэквивалентности являлось открытым, сравнительным, рандомизированным, перекрёстным клиническим исследованием с повторным дизайном с четырьмя периодами по оценке биоэквивалентности двухкомпонентного препарата Телзап® Плюс (телмисартан + гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, компания Зентива к.с., Чешская Республика) относительно препарата МикардисПлюс® (телмисартан + гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, компания Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко. КГ, Германия) при однократном повторном приёме внутрь натощак здоровыми добровольцами одной дозы каждого из них.

Всего было отобрано 110 человек, 63 добровольца были включены в исследование. Трое добровольцев

выбыли из исследования до начала дозирования по причине двух случаев головокружения и одного случая обморока. Двое участников выбыли из исследования: один доброволец после первого периода – по собственному желанию, другой после второго периода – по причине перелома ноги. 6 человек приняли участие в исследовании в качестве дублёров.

В первом периоде препарат приняли 60 человек, во втором – 59 человек, в третьем – 58 человек, в четвёртом – 58 человек.

Средний возраст добровольцев и дублёров составил 27,2±8,2 лет, рост – 170,9±10,7 см, масса тела – 69,7±13,4 кг, средний индекс массы тела – 23,6±3,2 кг/м^2.

Все добровольцы были разделены на 2 группы: А и Б. Каждый доброволец был отнесён к одной из групп с определённой последовательностью приёма препаратов: RTRT или TRTR. Добровольцы, включённые в группу А, в первом и третьем периоде исследования получали исследуемый препарат (T), а представители группы Б – препарат сравнения (R).

Во втором и четвёртом периодах исследования назначение препарата было обратным: представители группы А получали препарат сравнения (R), а представители группы Б – исследуемый препарат (T). Это означало, что группа А получала лекарственный препарат в последовательности TRTR, а группа Б получала лекарственный препарат в последовательности RTRT. Таким образом, общая схема исследования была «TRTR | RTRT».

По причине вместимости клинического отдела добровольцы были разделены на 2 подгруппы по 30 человек. Добровольцы каждой подгруппы находились в том же клиническом центре, следовали одинаковым процедурам и требованиям протокола. Получение препарата и манипуляции с кровью проводились в одинаковых условиях (включая, но не ограничиваясь использованием одинакового типа и производства внутривенных катетеров, игл, одинаковых систем дезинфекции, типов лабораторных и транспортных пробирок, морозильных камер и т. д.).

Все добровольцы из обеих подгрупп получали одинаковую пищу в каждом из периодов госпитализации, соблюдался единый интервал времени между периодами (период «отмывания»).

Исследуемые препараты

В качестве препарата сравнения (референтного, R) использовался:

– МикардисПлюс® (телмисартан + гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко. КГ, Германия, номер серии 207787),

В качестве исследуемого препарата (тест, T) использовался:

–Телзап® Плюс (телмисартан + гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, Зентива к.с., Чешская Республика, номер серии 033065).

Введение препарата и отбор образцов

В соответствии с законодательной и нормативной базой исследование было выполнено с предоставленными Спонсором образцами исследуемого препарата и препарата сравнения. Исследуемый препарат применялся внутрь, в дозе 80 мг + 12,5 мг (1 таблетка), препарат сравнения принимался в аналогичной дозе, каждый препарат в составе отдельной таблетки. Доброволец запивал таблетку 200 мл воды, натощак.

Образцы крови отбирались с помощью постоянного катетера, установленного в вену предплечья в течение 16 часов после приёма препарата. Начиная со второго взятия крови, перед каждой точкой забора крови из катетера 1 мл крови удалялся для исключения попадания гепарина в образец крови. После каждого забора крови из катетера он промывался 0,5 мл гепаринизированного физиологического раствора (500 МЕ на 100 мл 0,9 % натрия хлорида) во избежание его тромбирования. Катетер был удалён после взятия образцов крови через 16 часов после приёма препарата. Образцы крови в точке 24, 48 и 72 часа отбирались путём прямой венепункции. Отбор образцов крови осуществлялся в вакуумные пробирки (вакутейнеры) объёмом 4 мл, содержащие K_2ЭДТА в качестве антикоагулянта.

В каждую вакуумную пробирку отбиралось 4 мл крови, пробирки перемешивались, через 30 минут центрифугировались при охлаждении. Плазму из супернатанта переносили в две предварительно промаркированные криопробирки (аналитическая аликвота (А) и архивная (В)), объём аналитической аликвоты составлял не менее 1,5 мл. После переноса плазмы в криопробирки её незамедлительно замораживали на сухом льду. В дальнейшем образцы хранились при температуре ≤ –20 °С. Индивидуальные комплекты хранились в разных морозильных камерах. Таким образом, до отправки все образцы хранились в клиническом центре в морозильной камере с контролируемой температурой ≤ –20 °С.

В каждом периоде отбиралось 23 образца плазмы крови, взятых у всех добровольцев в течение четырёх периодов исследования в следующих временных точках: 0 (до приёма препарата), через 0:15, 0:30, 0:45, 1:00, 1:15, 1:30, 1:45, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30; 4:00, 4:30; 5:00; 6:00, 8:00, 12:00, 16:00, 24:00; 36:00, 48:00, 72:00 ч.

Подробности приведены в разделе *Результаты и обсуждение*.

Анализ концентрации действующих веществ в образцах

Для определения концентраций телмисартана и гидрохлоротиазида в образцах, полученных в клинической части исследования, была разработана ВЭЖХ-МС/МС методика определения данных веществ в плазме крови на K_2EDTA, валидированная в соответствии с руководствами [10, 11]. В качестве внутренних стандартов использовались изотопно-

меченные (дейтерированные) аналоги телмисартана и гидрохлоротиазида.

Валидация методики включала в себя определение точности и прецизионности в течение 3 независимых серий анализа. Для всех калибровочных стандартов и контрольных образцов отклонения точности и прецизионности не превышали допустимых значений, что демонстрирует высокую воспроизводимость метода. Исследование стабильности аналитов показало их стабильность в плазме и основных растворах при 4-кратном размораживании/замораживании. Аналиты также стабильны в плазме и рабочих растворах при краткосрочном хранении при комнатной температуре. Аналитический диапазон методики составил 10,0–2000,0 нг/мл для телмисартана, 0,9–200,0 нг/мл для гидрохлоротиазида в плазме. Для расчёта концентраций использовалась взвешенная линейная регрессия. Подготовка проб осуществлялась методом депротеинизации ацетонитрилом (осаждения белков). Полученные депротеинизаты были проанализированы на ВЭЖХ-МС/МС-системе: хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies) с гибридным масс-спектрометром с тройным квадруполем и ионизацией электроспреем 5500 QTrap (AB Sciex Corp).

Персонал, участвующий в выполнении биоаналитического анализа, не был проинформирован о схеме рандомизации и не обладал информацией о последовательности приёма исследуемого препарата и препарата сравнения.

Результаты и обсуждение / Results and Discussion

Участники исследования и безопасность

С момента подписания информированных согласий до окончания наблюдения за добровольцами было выявлено 43 нежелательных явления (НЯ) лёгкой степени тяжести и 1 НЯ тяжёлой степени тяжести (закрытый перелом левой большеберцовой и малоберцовой костей) у одного из добровольцев.

Соотношение частоты развития НЯ составило: 16 – после приёма тестового препарата, 18 – после приёма референтного препарата, 10 – не были связаны с приёмами препаратов.

В большинстве случаев связь с приёмом препарата, оценённая как Определённая и Вероятная, была обусловлена основным действием препарата (брадикардия и гипотония). В 4 случаях возникновения головной боли и 1 случае тахикардии связь с приёмом препарата была оценена как Вероятная. В остальных случаях возникновения НЯ связь с приёмом препарата была оценена как неклассифицируемая или Сомнительная. Во время второго периода исследования один доброволец выбыл из исследования из-за развития НЯ (по причине закрытого перелома левой большеберцовой и малоберцовой костей).

В 43 из 44 случаях исходом НЯ являлось выздоровление, в 1 из 44 случаев (перелом, указанный ранее) период выздоровления и восстановления у добровольца занимал продолжительное время.

Фармакокинетические параметры и оценка биоэквивалентности

Фармакокинетические параметры телмисартана

Средние значения основного параметра, характеризующего биодоступность действующего вещества из лекарственной формы – площади под фармакокинетической кривой, AUC_{0-72} – для исследуемого и референтного препаратов (M±SD) составили 1501,26±1021,76 нг·ч/мл (диапазон от 185,36 до 4206,03 нг·ч/мл) и 1602,39±1211,41 нг·ч/мл (диапазон от 184,62 до 5811,92 нг·ч/мл), соответственно, и представлены на рис. 1.

Средние значения максимальных концентраций телмисартана (C_{max}), определяемых в плазме крови добровольцев при приёме исследуемого препарата (M ± SD) составили 399,01±280,58 нг/мл (диапазон от 43,68 до 1508,70 нг/мл), для референтного – 416,01±296,16 нг/мл (диапазон от 42,32 до 1402,98 нг/мл).

Медианы времени достижения максимальной концентрации (T_{max}) для исследуемого и референтного препарата были равны (M±SD) 1,22±0,75 ч и 1,13±0,66 ч для исследуемого и референтного препаратов, соответственно. Для исследуемого и референтного препаратов получены следующие значения показателей: $T_{1/2}$ 12,25±8,99 ч и 12,47±9,15 ч, соответственно, λ_z 0,10±0,08 $ч^{-1}$ и 0,11±0,10 $ч^{-1}$, соответственно. Данные представлены в табл. 1.

Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров AUC_{0-72} (T) / AUC_{0-72} (R), характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референтному, составило 93,69 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров C_{max} (T) / C_{max} (R), характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 95,91 %.

Фармакокинетические параметры гидрохлоротиазида

Средние значения основного параметра, характеризующего биодоступность действующего вещества из лекарственной формы – площади под фармакокинетической кривой, AUC_{0-72} – для исследуемого и референтного препаратов (M±SD) составили 512,61±135,69 нг·ч/мл (диапазон от 228,37 до 998,84 нг·ч/мл) и 512,52±112,60 нг·ч/мл (диапазон от 288,19 до 786,91 нг·ч/мл), соответственно и представлены на рис. 2.

Средние значения максимальных концентраций гидрохлоротиазида (C_{max}), определяемых в плазме крови добровольцев при приёме исследуемого препарата (M±SD) составили 84,01±28,22 нг/мл (диапазон от 32,22 до 220,43 нг/мл), для референтного – 84,11± ±24,86 нг/мл (диапазон от 38,97 до 183,24 нг/мл).

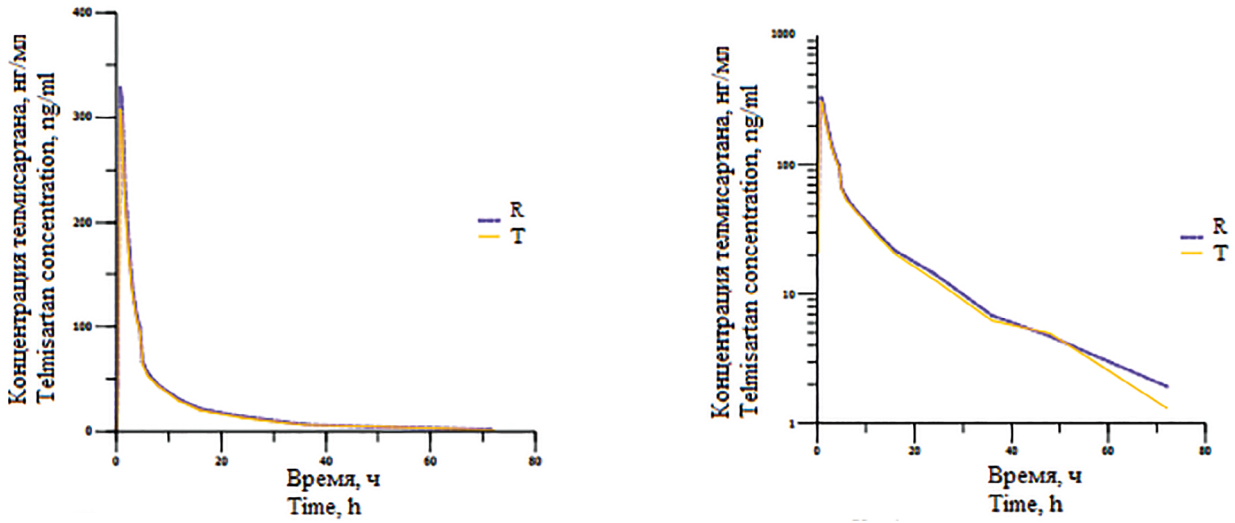


Рис. 1. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили телмисартана в плазме крови добровольцев после двукратного приёма комбинированного исследуемого препарата Телзап® Плюс (телмисартан + гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, Зентива к.с., Чешская Республика) в сравнении с приёмом референтного препарата МикардисПлюс® (телмисартан + гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко. КГ, Германия), T – исследуемый (тестируемый) препарат, R – препарат сравнения (референтный). Полулогарифмическая (снизу) и линейная (сверху) шкалы.

Fig. 1. Average pharmacokinetic profiles of telmisartan in blood plasma after a double administration under fasting of Telzap® Plus (telmisartan+hydrochlorothiazide, tablets 80 mg + 12,5 mg, Zentiva KS company, Czech Republic) and MikardisPlus® (telmisartan+hydrochlorothiazide, tablets 80 mg + 12,5 mg, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Germany), T – test formulation, R – reference formulation. Semi-logarithmic (bottom) and linear (top) scales.

Источник: Хохлов А.Л. и соавт., 2022

Source: Khokhlov AL et al., 2022

Таблица 1

Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров телмисартана (N – число измерений, CV – коэффициент вариации)

Table 1

Summary average pharmacokinetic parameters of telmisartan (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	N	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T)		Референтный препарат (R) Reference formulation (R)		Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)
		Среднее Average	КВ, (%) CV, (%)	Среднее Average	КВ, (%) CV, (%)	
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	117	399,01	70,32	416,01	71,19	95,91
t_{max}, ч t_{max}, h	117	1,22	61,08	1,13	58,20	107,96
AUC_{0-72}, нг·ч/мл AUC_{0-72}, ng·h/ml	117	1501,26	68,06	1602,39	75,60	93,69
λ_z, $ч^{-1}$ λ_z, h^{-1}	117	0,10	83,74	0,11	93,02	90,91
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	117	12,25	73,37	12,47	73,41	98,24

Медианы времени достижения максимальной концентрации (T_{max}) для исследуемого и референтного препарата были равны 1,84 ч и 1,60 ч, соответственно.ч. Средние значения данного показателя (M ± SD) составили 1,84±0,66 ч и 1,60±0,54 ч для исследуемого и референтного препаратов, соответственно. Для исследуемого и референтного препаратов получены следующие значения показателей: $T_{1/2}$ – 9,57±1,84 ч и 9,64±2,24 ч, соответственно, λ_z – 0,08 ± 0,018 $ч^{-1}$ и 0,08 ± 0,016 $ч^{-1}$, соответственно. Данные представлены в табл. 2.

Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров AUC_{0-72} (T) / AUC_{0-72} (R), характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референтному,

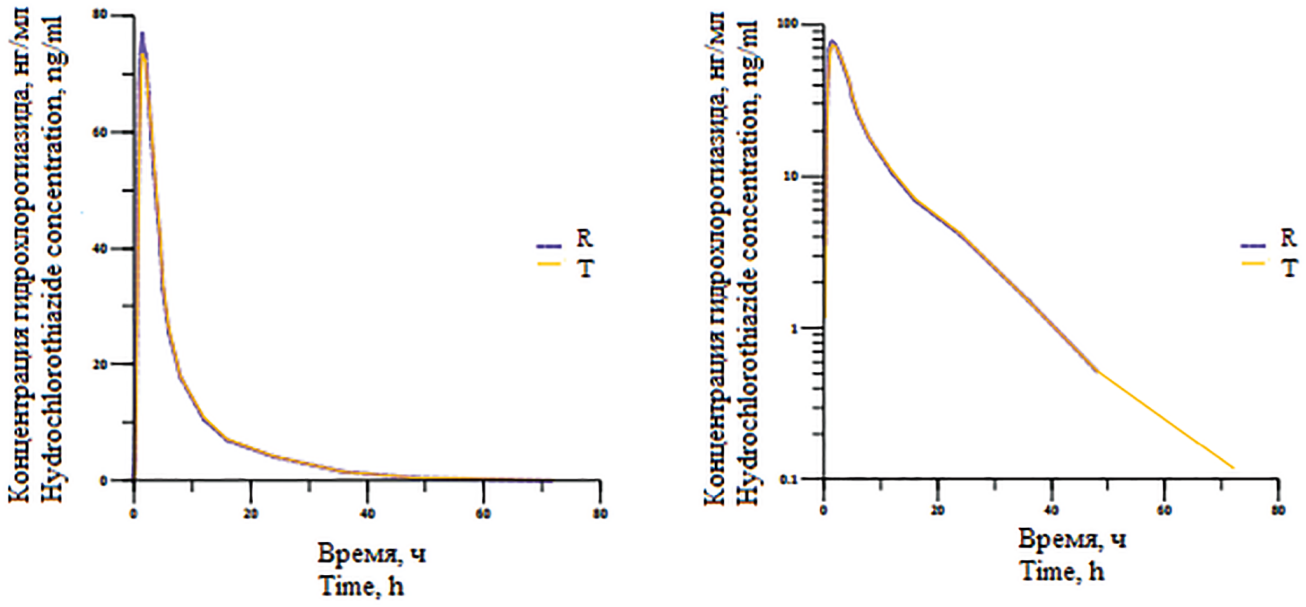


Рис. 2. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили гидрохлоротиазида в плазме крови добровольцев после двукратного приёма комбинированного исследуемого препарата Телзап® Плюс (телмисартан +гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, Зентива к.с., Чешская Республика) в сравнении с приёмом референтного препарата МикардисПлюс® (телмисартан + гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко. КГ, Германия), T – исследуемый (тестируемый) препарат, R – препарат сравнения (референтный). Полулогарифмическая (снизу) и линейная (сверху) шкалы.
Fig. 2. Average pharmacokinetic profiles of hydrochlorothiazide in blood plasma after a double administration under fasting of Telzap® Plus (telmisartan+hydrochlorothiazide, tablets 80 mg + 12,5 mg, Zentiva KS company, Czech Republic) and MikardisPlus® (telmisartan+hydrochlorothiazide, tablets 80 mg + 12,5 mg, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Germany), T – test formulation, R – reference formulation. Semi-logarithmic (bottom) and linear (top) scales.
Источник: *Хохлов А.Л. и соавт.*, 2022
Source: Khokhlov AL et al., 2022

Таблица 2

Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров гидрохлоротиазида (N – число измерений, КВ – коэффициент вариации)

Table 2

Summary average pharmacokinetic parameters of hydrochlorothiazide (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	N	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T)		Референтный препарат (R) Reference formulation (R)		Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)
		Среднее Average	КВ, (%) CV, (%)	Среднее Average	КВ, (%) CV, (%)	
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	117	84,01	33,60	84,11	29,56	99,88
t_{max}, ч t_{max}, h	117	1,84	36,12	1,60	33,86	115,00
AUC_{0-72}, нг·ч/мл AUC_{0-72}, ng·h/ml	117	512,61	26,47	512,52	21,97	100,02
λ_z, $ч^{-1}$ λ_z, h^{-1}	117	0,08	22,88	0,08	20,02	100,00
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	117	9,57	19,18	9,64	23,28	99,27

Таблица 3

ДИ для отношений фармакокинетических параметров C_{max} и AUC_{0-72} (N – число измерений, CV – коэффициент вариации, T – исследуемый препарат, R – препарат сравнения)

Table 3

CI for C_{max} and AUC_{0-72} ratios (N – number of observations, CV – coefficient of variation, T – test formulation, R – reference formulation)

Параметр Parameter	Средние геометрические Geometric mean			Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)	90 % ДИ, (%) 90 % CI, (%)		БЭ BE
	N	T	R		Нижний Lower	Верхний Upper	
Телмисартан Telmisartan							
AUC_{0-72}, нг·ч/мл AUC_{0-72}, ng·h/ml	117	1166,2	1200,6	97,13	92,12	102,42	ДА1 Yes1
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	117	311,4	325,9	95,56	88,53	103,15	ДА2 Yes2
Гидрохлоротиазид Hydrochlorothiazid							
AUC_{0-72}, нг·ч/мл AUC_{0-72}, ng·h/ml	117	495,6	500,1	99,09	96,53	101,71	ДА1 Yes1
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	117	79,8	80,7	98,91	95,34	102,61	ДА1 Yes1

Примечания: [1]Границы ДИ: 80,00–125,00 %; [2]Границы ДИ: 79,30–126,11%, так как CV_{intra} для референтного препарата составило 31,25 %.
Notes: [1]CI range: 80,00– 25,00 %; [2]CI range: 79,30–126,11%, because CV_{intra} of reference formulation is 31,25%.

составило 100,02 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров C_{max} (T) / C_{max} (R), характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 99,88 %.

Оценка биоэквивалентности

Биоэквивалентность исследуемого и референтного препаратов оценивали на основании 90 % ДИ значений AUC_{0-72} и C_{max} телмисартана и гидрохлоротиазида как основных параметров. Согласно протоколу, препараты считались биоэквивалентными, если границы оцененного ДИ для AUC_{0-72} и C_{max} находились в пределах 80,00–125,00% (при подтверждении, что вариабельность C_{max} телмисартана референтного препарата составляет более 30 %, границы 90 % ДИ для данного фармакокинетического параметра могли быть увеличены в соответствии с протоколом).

Для телмисартана точечная оценка индивидуальных отношений AUC_{0-72} (T) / AUC_{0-72} (R) составила 97,13 %, 90 % ДИ: 92,12–102,42%, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00 %). Точечная оценка индивидуальных отношений C_{max} (T) / C_{max} (R) составила 95,56 %, 90 % ДИ: 88,53–103,15 %, что находится в рамках допустимого расширенного диапазона (79,30–126,11 %). Диапазон был расширен на основании полученных в исследовании данных о высокой внутрисубъектной вариабельности параметра C_{max} для референтного лекарственного препарата: значение CV_{intra} для него составило 31,25 % (более 30 %), в соответствии с этой величиной рассчитан допустимый расширенный диапазон ДИ. Данный подход описан Руководством по экспертизе лекарственных средств, Том 1 [9], руководством ЕАЭС [10]. Отметим, что авторы других опубликованных исследований биоэквивалентности также нередко сталкивались с необходимостью расширения ДИ для телмисартана [12–15].

Для гидрохлоротиазида точечная оценка индивидуальных отношений AUC_{0-72} (T)/AUC_{0-72} (R) составила 99,09 %, 90 % ДИ: 96,53–101,71 %, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00%). Точечная оценка индивидуальных отношений C_{max} (T) / C_{max} (R) составила 98,91 %, 90% ДИ: 95,34–102,61 %, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00 %). Данные представлены в табл. 3.

Результаты исследования биоэквивалентности послужили основанием для регистрации препарата Телзап® Плюс (телмисартан + гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, Зентива к.с., Чешская Республика.

Заключение / Conclusion

В рамках регистрации комбинированного препарата Телзап® Плюс было проведено исследование его биоэкивалентности относительно препарата МикардисПлюс® при однократном приёме здоровыми добровольцами натощак. На основании полученных данных можно констатировать, что исследуемые препараты характеризуются высокой степенью сходства показателей фармакокинетики. Индивидуальные и усреднённые профили фармакокинетических кривых исследуемого и референтного препаратов как телмисартана, так и гидрохлоротиазида имеют совпадающие формы. Исследуемые препараты характеризуются близкими значениями относительной биодоступности телмисартана и гидрохлоротиазида и максимальной концентрацией телмисартана и гидрохлоротиазида.

Доверительные интервалы для отношений средних геометрических значений оцениваемых показателей телмисартана и гидрохлоротиазида исследуемого и референтного препаратов полностью соответствуют установленным пределам.

Таким образом, выполненное исследование позволяет констатировать биоэквивалентность двухкомпонентного препарата Телзап® Плюс (телмисартан + гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, компания Зентива к.с., Чешская Республика), относительно препарата МикардисПлюс® (телмисартан + гидрохлоротиазид, таблетки 80 мг + 12,5 мг, компания Берингер Ингельхайм Фарма ГмбХ и Ко. КГ, Германия).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. *Лебедева О. В.* управляла всеми этапами исследования биоэквивалентности со стороны Спонсора, *Хохлов А. Л.*, *Хохлов А. А.*, *Мирошников А. Е.* руководили клиническим этапом исследования; *Гребенкин Д. Ю.* участвовал в оформлении рукописи.

Contribution of the authors. *Lebedeva OV* managed all stages of the bioequivalence study from the Sponsor side; *Khokhlov AL*, *Khokhlov AA*, *Miroshnikov AE* were responsible for the clinical phase of the study; *Grebenkin DYu* wrote the text of the manuscript.

Конфликт интересов. Исследование спонсировалось АО «Санофи-авентис груп», *Лебедева О. В.* является сотрудником данной компании; *Хохлов А. А.* является сотрудником ООО «АХ СТ». *Мирошников А. Е.* является сотрудником ООО «КлинФармИнвест», выполнявший данное контрактное исследование для АО «Санофи-авентис груп»; *Хохлов А. Л.*, *Гребенкин Д. Ю.* заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The study was sponsored by Sanofi *Lebedeva OV* is an employee of this company; *Khokhlov AA* is an employee of LLC "AH ST". *Miroshnikov AE* is an employee of KlinFarmInvest LLC, who performed this contract research for Sanofi; *Khokhlov AL*, *Grebenkin DYu* declare that there is no conflict of interest.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Хохлов Александр Леонидович
e-mail: al460935@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0032-0341
SPIN-код: 9389-8926
д. м. н., проф., академик РАН, зав. кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, ректор ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ярославль, Российская Федерация; Председатель Совета по этике при Министерстве здравоохранения РФ, Ярославль, Российская Федерация

Khokhlov Alexander L.
e-mail: al460935@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0032-0341
SPIN code: 9389-8926
Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Head Chair of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Rector of Yaroslavl State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Yaroslavl, Russian Federation; Chairman of the Ethics Council under the Ministry of Health of the Russian Federation, Yaroslavl, Russian Federation

Хохлов Александр Александрович
e-mail: aa_khokhlov@cphinvest.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-3307-0705
к. м. н., менеджер по клиническим исследованиям ООО «АХ СТ», Ярославль, Российская Федерация

Khokhlov Alexander A.
e-mail: aa_khokhlov@cphinvest.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-3307-0705
PhD, Cand. Sci. Med., clinical trials manager LLC «AH ST», Yaroslavl, Russian Federation

Мирошников Алексей Евгеньевич
e-mail: ae_miroshnikov@cphinvest.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6657-3950
SPIN-код: 8896-8993
к. м. н., ООО «КлинФармИнвест», Ярославль, Российская Федерация

Miroshnikov Alexei E.
e-mail: ae_miroshnikov@cphinvest.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6657-3950
SPIN code: 8896-8993
PhD, Cand. Sci. Med., LLC ClinPharmInvest, Yaroslavl, Russian Federation

Лебедева Ольга Владимировна
e-mail: Olga.Lebedeva@sanofi.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7983-685X
PhD, руководитель клинических проектов, Представительство АО «Санофи-авентис груп» (Франция), Москва, Российская Федерация

Lebedeva Olga V.
e-mail: Olga.Lebedeva@sanofi.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7983-685X
PhD, clinical project leader, Representative office of Sanofi (France), Moscow, Russian Federation

Гребенкин Дмитрий Юрьевич
Автор, ответственный за переписку
e-mail: dmitrii.grebenkin@exactelabs.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9304-8000
к. фарм. н., руководитель лаборатории фарманализа, ООО «Экзактэ Лабс», Москва, Российская Федерация

Grebenkin Dmitry Yu.
Corresponding author
e-mail: dmitrii.grebenkin@exactelabs.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9304-8000
PhD, Cand. Pharm Sci., Head of the farmanalysis laboratory, Exacte Labs LLC, Moscow, Russian Federation

Список литературы / References

1. Бойцов С.А., Баланова Ю.А., Шальнова С.А. и др. Артериальная гипертония среди лиц 25–64 лет: распространённость, осведомлённость, лечение и контроль. По материалам исследования ЭССЕ // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014. Т. 13. № 4. С. 4–14. [Boytsov SA, Balanova YuA, Shalnova SA, et al. Arterial hypertension among individuals of 25–64 years old: prevalence, awareness, treatment and control. By the data from ESSERF. ***Cardiovascular Therapy and Prevention.*** 2014;13(4):4–14. (In Russ).]. DOI:10.15829/1728-8800-2014-4-4-14.

2. Williams B., Mancia G., Spiering W, et al. ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur Heart J*. 2018;39(33):3021–3024. DOI:10.1093/eurheartj/ehy339.

3. Подзолков В.И., Тарзиманова А.И. Фиксированные комбинации в лечении артериальной гипертензии: новые возможности // *Российский кардиологический журнал*. 2018. № 5. С. 68–73. [Podzolkov VI., Tarzimanova AI. Fixed combinations in arterial hypertension treatment: novel opportunities. *Rossiiskii kardiologicheskii zhurnal*.2018; (5):68–73. (In Russ).].

4. Neldam S., Edwards C, et al. ATHOS Study Group. Telmisartan plus hydrochlorothiazide compared with amlodipine plus hydrochlorothiazide in older patients with systolic hypertension: Results from a large ABPM study. *Am J Geriat Cardiol*. 2006;15:151–160. DOI:10.1111/j.1076-7460.2006.05219.x.

5. Zaletel A., Knavs Vrhunec P., Barbič-Žagar B. Achieving Blood Pressure Control with Telmisartan and Fixed Dose Combination of Telmisartan and Hydrochlorothiazide. *Cardiol Croat*. 2016;11(10-11):594–597. DOI:10.15836/ccar2016.594.

6. Подзолков В.И., Тарзиманова А.И. Новое поколение блокаторов рецепторов ангиотензина // *Системные Гипертензии*. 2013. Т. 10. № 3. С. 80–85. [Podzolkov VI., Tarzimanova AI. A new generation of blockers receptors of angiotensin. *Systemic Hypertension*. 2013,10(3),80–85. (In Russ).].

7. Остроумова О.Д., Кочетков А.И. Антигипертензивные и органопротективные свойства фиксированной комбинации телмисартана и гидрохлоротиазида // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2019. Т. 15. № 4. С. 558–565. [Ostroumova OD., Kochetkov AI. Antihypertensive and target-organ protective properties of telmisartan and hydrochlorothiazide single-pill combination. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2019; 15(4):558–565. (In Russ).].

8. Щулькин А. В., Попова Н. М., Черных И. В. Оригинальные и воспроизведённые лекарственные препараты: современное состояние проблемы // *Наука молодых–Eruditio Juvenium*. 2016. № 2. С. 30–35. [Shulkin AV., Popova NM., Chernykh IV. The original and generic drugs: current state of the problem. Nauka molodykh–Eruditio Juvenium. 2016; (2), 30–35. (In Russ).].

9. Ушкалова Е.А., Зырянов С.К., Ушкалова А.В. Воспроизведённые лекарственные средства и особенности их регулирования // *Неврология, Нейропсихиатрия, Психосоматика*. 2016. Т. 8. № 3. С. 82–87. [Ushkalova EA., Zyryanov SK., Ushkalova AV. Generics and the specific features of their regulation. *Nevrologija, nejropsihiatrija, psichosomatika – Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics*. 2016; 8(3): 82–87 (in Russ).].

10. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013; 280. [Mironov AN. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennyh sredstv. T. I. Moscow: Grif and K; 2013. (In Russ).].

11. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016. [Pravila provedeniya issledovanij bioekvivalentnosti lekarstvennyh sredstv Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza. 2016. (In Russ).].

12. Zhang P., Zhang Y., Chen X, et al. Pharmacokinetics of telmisartan in healthy Chinese subjects after oral administration of two dosage levels. *Arzneimittelforschung*. 2006;56(8):569–573. DOI: 10.1055/s-0031-1296753.

13. Kang W.Y., Seong S.J., Ohk B, et al. Pharmacokinetic and bioequivalence study of a telmisartan/S-amlodipine fixed-dose combination (CKD-828) formulation and coadministered telmisartan and S-amlodipine in healthy subjects. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018. 12:545–553. DOI: 10.2147/DDDT.S156492.

14. Paramanindita A.S., Harahap Y., Prasaja B., Wijayanti T.R., Lusthom W., Sofiah R.E., Sandra M., Trisari Y. A Bioequivalence Study of Two Telmisartan 80 mg Tablets in Healthy Indonesian Subjects: An Open Label, Three-way, Three-period, Partial Replicate Crossover Study. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2020;46(11);1747–1752. DOI: 10.1080/03639045.2020.1820042

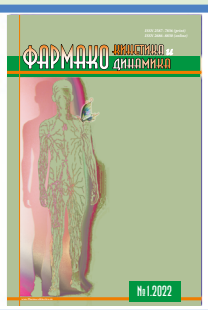
15. EMA/576613/2010 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) assessment report on telmisartan/amlodipine. [cited 2022 Feb 10]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/twynsta-epar-public-assessment-report_en.pdf

Издательство
ОКИ

ООО «Издательство ОКИ» выпускает 5 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

УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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