



2023 Том / Volume XI

№ 4

Научно-практический журнал
Scientific and Practical Journal

ISSN 2307-9266
e-ISSN 2413-2241

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACY & PHARMACOLOGY



Обзоры, лекции
Reviews, Lectures

Фармакогнозия, ботаника
Pharmacognosy, Botany

**Фармацевтическая технология
и биотехнология**
Pharmaceutical Technology
and Biotechnology

**Фармацевтическая
и токсикологическая химия**
Pharmaceutical and Toxicological
Chemistry

**Фармакология и клиническая
фармакология**
Pharmacology and Clinical
Pharmacology

**Информационные технологии
в фармации**
Information Technologies in Pharmacy

**Организация и экономика
фармацевтического дела**
Organization and Economy
of Pharmacy

**Экономика и менеджмент
медицины**
Economy and Management
of Medicine

Фармацевтическое образование
Pharmaceutical Education

**Дискуссии, рецензии, юбилеи,
научные школы, история
фармации и фармакологии**
Discussions, Referee Reports,
Anniversaries, Schools
of Thought, History
of Pharmacy and
Pharmacology



Научно-практический журнал

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Периодичность 6 номеров в год

Том 11, Выпуск 4, 2023

Свидетельство регистрации СМИ:
ПИ № ФС77–67428 от 13.10.2016 г.

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Главный редактор

Петров В.И. академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Заместители главного редактора

Озеров А.А. доктор химических наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Черников М.В. доктор медицинских наук, доцент, г. Пятигорск, Россия

Редакционная коллегия

Фармакогнозия, ботаника

Куркин В.А. доктор фармацевтических наук, профессор, г. Самара, Россия

Зилфикаров И.Н. профессор РАН, доктор фармацевтических наук, г. Москва, Россия

Фармацевтическая технология и биотехнология

Саканян Е.И. доктор фармацевтических наук, профессор, г. Москва, Россия

Фармацевтическая и токсикологическая химия / Информационные технологии в фармации

Вавер И. PhD, профессор, г. Варшава, Польша

Фармакология и клиническая фармакология

Ханферьян Р.А. доктор медицинских наук, профессор, г. Москва, Россия

Буске П. MD, профессор, г. Страсбург, Франция

Кампизи К. MD, PhD, профессор, г. Генуя, Италия

Организация и экономика фармацевтического дела / Экономика и менеджмент медицины

Наркевич И.А. доктор фармацевтических наук, профессор, г. Санкт-Петербург, Россия

Егорова С.Н. доктор фармацевтических наук, профессор, г. Казань, Россия

Сомасундарам С. MD, Россия/Индия

Статьи, представленные в разделы **Обзоры, лекции / Фармацевтическое образование / Дискуссии, рецензии, юбилеи, научные школы, история фармации и фармакологии** могут быть рассмотрены любыми членами редакционной коллегии.

Ответственный секретарь: Корянова Ксения Николаевна, кандидат фармацевтических наук, г. Пятигорск, Россия

Корректор: Мищенко Екатерина Сергеевна, кандидат фармацевтических наук, г. Пятигорск, Россия

Переводчик: Давыденко Любовь Григорьевна, кандидат филологических наук, доцент, г. Пятигорск, Россия

Технический редактор: Доценко Марина Александровна, г. Пятигорск, Россия

Учредитель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

Адрес издательства: 357532, г. Пятигорск, пр-кт Калинина, 11.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России

Телефон: +7 (8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

www.pharmpharm.ru

Объединенный каталог. Пресса России. Газеты и журналы. Индекс 94183

Формат А4, тираж 1000 экз. Цена свободная.

Журнал «Фармация и фармакология» включен в перечень рецензируемых научных изданий, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (Перечень ВАК), Scopus, Web of Science (ESCI), РИНЦ, eLibrary, ВИНТИ, РГБ, КиберЛенинка, Соционет, EMBASE, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Отпечатано в соответствии с предоставленными материалами в ООО «Бюро новостей», 355000, г. Ставрополь, ул. Серова, 278А.

© ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, 2023

© Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, 2023

© Авторы, 2023

Scientific and Practical Journal

PHARMACY & PHARMACOLOGY

Scientific and practical journal

Volume XI, Issue 4, 2023

The mass media registration certificate:

ПИ № ФС77-67428 от 13.10.2016

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Editor-in-Chief

Vladimir I. Petrov

Academician RAS, Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Volgograd, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Aleksandr A. Ozerov

Doctor of Sciences (Chemistry), Professor, Volgograd, Russia

Maxim V. Chernikov

Doctor of Sciences (Medicine), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia

Editorial Board

Pharmacognosy, Botany

Vladimir A. Kurkin

Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Samara, Russia

Ifrat N. Zilfikarov

Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor of RAS, Moscow, Russia

Pharmaceutical Technology and Biotechnology

Elena I. Sakanyan

Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Moscow, Russia

Pharmaceutical and Toxicological Chemistry / Information Technologies in Pharmacy

Iwona Wawer

PhD, Professor, Warsaw (Poland)

Pharmacology and Clinical Pharmacology

Roman A. Khanfer`yan

Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Moscow, Russia

Pascal Bousquet

MD, PhD, Professor, Strasbourg, France

Campisi Corradino

MD, PhD, Professor, Genoa, Italy

Organization and Economy of Pharmacy / Economy and Management of Medicine

Igor A. Narkevich

Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Saint-Petersburg, Russia

Svetlana N. Egorova

Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Kasan, Russia

Somasundaram Subramanian

MD, Russia/India

Manuscripts presented in sections **Reviews, Lectures / Pharmaceutical Education / Brief Reports / Discussions, Referee Reports, Anniversaries, School of Thought, History of Pharmacy and Pharmacology** can be considered by any members of the editorial board.

Executive Editor: Koryanova Ksenia N., Candidate of Sciences (Pharmacy), Pyatigorsk, Russia

Proofreader: Mischenko Ekaterina S., Candidate of Sciences (Pharmacy), Pyatigorsk, Russia

Translator: Davydenko Lubov G., Candidate of Sciences (Philology), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia

Technical editor: Dotsenko Marina A., Pyatigorsk, Russia

Founder: Volgograd State Medical University. 1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

Editors office address: 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University

Phone number: +7(8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

www.pharmpharm.ru

Union catalogue. Russian Press / Newspapers and journals. Code 94183

A4 size, 1000 issues circulation. Price free

Journal "Pharmacy & Pharmacology" is recommended International Committee Of Medical Journal Editors and included in Higher Attestation Commission, Scopus, Web of Science (ESCI), Russian citation database, eLibrary, ARISTI (All-Russian Institute of Scientific and Technical Information), RSL (Russian State Library), CyberLeninka, Socionet, EMBASE, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Printed in the LLC "Buro novostey" in accord with provided materials. 278A, Serova Str., Stavropol, 355000.

© Volgograd State Medical University, 2023

© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University, 2023

©Authors, 2023

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ / RESEARCH ARTICLE

<i>В.И. Петров, И.С. Аникеев, Т.Е. Заячникова, А.В. Стрыгин, Д.В. Куркин, Ю.С. Казьмина</i> Оптимизация терапевтического лекарственного мониторинга ванкомицина у новорожденных с применением метода «высушенной капли крови»280	<i>V.I. Petrov, I.S. Anikeev, T.E. Zayachnikova, A.V. Strygin, D.V. Kurkin, Yu.S. Kazmina</i> Optimization of therapeutic drug monitoring of vancomycin in newborns using “Dried Blood Spot” method280
<i>А.Х. Хумаири, Д.Л. Сперанский, В.В. Новочадов, С.В. Поройский, Н.В. Чердынцева, В.В. Удут</i> Противоопухолевая активность трех новых производных азолоазинов на модели ортотопической трансплантации клеток рака молочной железы человека мышам291	<i>A.H. Al-Humairi, D.L. Speransky, V.V. Novochadov, S.V. Poroisky, N.V. Cherdyntseva, V.V. Udu</i> Antitumor activity of three new azoloazine derivatives in orthotopic transplantation model of human breast cancer cells into mice291
<i>Е.А. Урбанчик, В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, В.М. Рыжов, А.В. Дубищев, А.С. Цибина, А.И. Алтарева, Ю.Д. Сироткина</i> Фитохимическое и фармакологическое исследование биологически активных веществ и сухих экстрактов почек тополя краснойкветочной (<i>Populus rubrinervis</i> Hort. Alb.) различной полярности.....301	<i>E.A. Urbanchik, V.A. Kurkin, E.N. Zaitceva, V.M. Ryzhov, A.V. Dubishchev, A.S. Tsibina, A.I. Altareva, Yu.D. Sirotkina</i> Phytochemical and pharmacological study of biologically active compounds and dry extracts of <i>Populus rubrinervis</i> Hort. Alb. buds of various polarities.....301
<i>Л.В. Корокина</i> Изучение возможностей фармакологической коррекции легочной гипертензии, индуцированной гипоксией, с использованием соединения фенольной природы с лабораторным шифром КУД975312	<i>L.V. Korokina</i> Studying the possibilities of pharmacological correction of hypoxia-induced pulmonary hypertension using a phenolic compound with a laboratory cypher KUD975.....312
<i>А.С. Аметов, И.Е. Шохин, Е.А. Рогожина, Т.Г. Бодрова, М.Е. Невретдинова, П.А. Белый, К.Я. Заславская, В.С. Щербакова, Д.В. Куркин, К.Н. Корянова, Е.С. Мищенко, Э.Ю. Кесова, Е.Д. Козлов, Е.С. Самошкина, Д.Н. Андреев, Ю.Г. Казаишвили, С.М. Носков, Л.А. Балыкова</i> Сравнительный анализ физико-химических свойств, биоэквивалентности, безопасности и переносимости отечественного семаглутида324	<i>A.S. Ametov, I.E. Shokhin, E.A. Rogozhina, T.G. Bodrova, M.E. Nevretdinova, P.A. Bely, K.Ya. Zaslavskaya, V.S. Scherbakova, D.V. Kurkin, K.N. Koryanova, E.S. Mishchenko, E.Yu. Kesova, E.D. Kozlov, E.S. Samoshkina, D.N. Andreev, Yu.G. Kazaishvili, S.M. Noskov, L.A. Balykova</i> Comparative analysis of physicochemical properties, bioequivalence, safety and tolerability of the first domestic semaglutide.....324

ОБЗОР / REVIEW

<i>Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.И. Морковин, В.И. Петров, А.В. Стрыгин, К.Н. Корянова, Ю.В. Горбунова, Ю.А. Колосов, О.В. Иванова, Е.В. Павлова, М.А. Джавахян, А.В. Заборовский, В.Б. Сапарова, И.Е. Макаренко, Р.И. Драй, А.Н. Чумаченко</i> Физиология и фармакология рецептора глюкагоноподобного пептида-1347	<i>D.V. Kurkin, D.A. Bakulin, E.I. Morkovin, V.I. Petrov, A.V. Strygin, K.N. Koryanova, Yu.V. Gorbunova, Yu.A. Kolosov, O.V. Ivanova, E.V. Pavlova, M.A. Dzhavahyan, A.V. Zaborovskiy, V.B. Saparova, I.E. Makarenko, R.I. Drai, A.N. Chumachenko</i> Physiology and pharmacology of glucagon-like peptide-1 receptor347
--	--

УДК 615.074



Оптимизация терапевтического лекарственного мониторинга ванкомицина у новорожденных с применением метода «высушенной капли крови»

В.И. Петров¹, И.С. Аникеев^{1,2}, Т.Е. Заячникова³, А.В. Стрыгин^{1,2}, Д.В. Куркин^{1,2}, Ю.С. Казьмина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

² Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
400087, Россия, г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39

³ Институт непрерывного медицинского и фармацевтического образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

E-mail: Anikeev.iv@gmail.com

Получена 31.07.2023

После рецензирования 15.10.2023

Принята к печати 30.10.2023

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) используется для повышения индивидуализации фармакотерапии, особенно у групп пациентов с высокой межиндивидуальной вариабельностью фармакокинетических (ФК) параметров. Одной из таких групп пациентов являются новорожденные дети, для которых лекарственная терапия, особенно препаратами с узким терапевтическим диапазоном, вызывает ряд трудностей или не может быть применена в принципе.

Цель. Разработка и валидация методов количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина в образцах «высушенной капли крови» с использованием новых протоколов и сравнение полученных данных с результатами в образцах плазмы с использованием стандартных методов пробоподготовки.

Материалы и методы. Для приготовления маточных и стандартных растворов ванкомицина и норванкомицина как внутреннего стандарта использовали сухие навески соответствующих сертифицированных стандартов ванкомицина (Servier, Франция) и норванкомицина (Augsburg, Германия, степ. чистоты >95,0%). Хроматографическое разделение компонентов проводили на колонке Poroshell 120 C18 (4,6×50 мм, 2,7 мкм). При разработке условий масс-спектрометрической детекции искомых веществ методом мониторинга множественных реакций (MRM) были определены ионы-предшественники и соответствующие им ионы-продукты.

Результаты. Разработана и валидирована методика количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина в образцах «высушенной капли». Провели сравнение между значениями концентраций ванкомицина в образцах «высушенной капли крови» и образцах плазмы. При этом более 95% рассчитанных средних концентраций находились в пределах $d-2s$ и $d+2s$, которые соответствовали значениям $-10,2$ и $12,2$, что подтверждало пригодность разработанного метода для анализа образцов пациентов.

Заключение. Полученные результаты позволяют рекомендовать метод «высушенной капли крови» для проведения терапевтического мониторинга ванкомицина, дополнительных исследований ФК у данной группы пациентов с последующим применением данного лекарственного препарата у новорожденных и пациентов детского возраста.

Ключевые слова: терапевтический лекарственный мониторинг; ванкомицин, ВЭЖХ/МС; валидация; биоаналитика; метод «высушенной капли крови»

Список сокращений: ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг; ФК – фармакокинетика; ФД – фармакодинамика; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; МС – масс-спектрометрия; НПКО – нижний предел количественного определения; КК – контроль качества; DBS – метод «высушенной капли крови».

Для цитирования: В.И. Петров, И.С. Аникеев, Т.Е. Заячникова, А.В. Стрыгин, Д.В. Куркин, Ю.С. Казьмина. Оптимизация терапевтического лекарственного мониторинга ванкомицина у новорожденных с применением метода «высушенной капли крови». *Фармация и фармакология*. 2023;11(4):280-290. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-280-290

© В.И. Петров, И.С. Аникеев, Т.Е. Заячникова, А.В. Стрыгин, Д.В. Куркин, Ю.С. Казьмина, 2023

For citation: V.I. Petrov, I.S. Anikeev, T.E. Zayachnikova, A.V. Strygin, D.V. Kurkin, Yu.S. Kazmina. Optimization of therapeutic drug monitoring of vancomycin in newborns using "Dried Blood Spot" method. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(4):280-290. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-280-290

Optimization of therapeutic drug monitoring of vancomycin in newborns using “Dried Blood Spot” method

V.I. Petrov¹, I.S. Anikeev^{1,2}, T.E. Zayachnikova³, A.V. Strygin^{1,2}, D.V. Kurkin^{1,2}, Yu.S. Kazmina¹

¹ Volgograd State Medical University,

1, Pavshih Borcov Sq., Volgograd, Russia, 400131

² Center for Innovative Medicines with Pilot Industrial Production of Volgograd State Medical University,
39, Novorossiyskaya Str., Volgograd, Russia, 400087

³ Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education of Volgograd State Medical University,
1, Pavshih Borcov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: Anikeev.iv@gmail.com

Received 31 July 2023

After peer review 15 Oct 2023

Accepted 30 Oct 2023

Therapeutic drug monitoring (TDM) is used to increase the individualization of pharmacotherapy, especially in patient groups with a high interindividual variability in pharmacokinetic (PK) parameters. One of these groups of patients is newborn children, for whom drug therapy, especially drugs with a narrow therapeutic range, causes a few difficulties or cannot be used in principle.

The aim of the work was to develop and validate quantitative HPLC-MS/MS methods for the determination of vancomycin in “dried blood spot” samples using new protocols and comparison of the results obtained with the results in plasma samples using standard sample preparation methods.

Materials and methods. To prepare stock and standard solutions of vancomycin and norvancomycin as an internal standard, dry portions of the corresponding certified standards of vancomycin (Servier, France) and norvancomycin (Augsburg, Germany, purity grade >95.0%) were used. A chromatographic separation of the components was carried out on a Poroshell 120 C18 column (4.6×50 mm, 2.7 μm). When developing conditions for a mass spectrometric detection of the desired substances using the multiple reaction monitoring (MRM) method, precursor ions and their corresponding product ions were determined.

Results. A quantitative HPLC-MS/MS method for the determination of vancomycin in «dried blood spot» samples was developed and validated. A comparison was made between vancomycin concentrations in «dried blood spot» samples and plasma samples. Moreover, more than 95% of the calculated average concentrations are within the limits of $d-2s$ and $d+2s$, which correspond to the values of -10.2 and 12.2 . That confirms the suitability of the developed method for the analysis of patient samples.

Conclusion. The results obtained make it possible for us to recommend the “dried blood spot” method for therapeutic monitoring of vancomycin, additional studies of PK in this group of patients with subsequent use of this drug in newborns and pediatric patients.

Keywords: therapeutic drug monitoring; vancomycin; HPLC/MS; validation; bioanalytics; dried blood spot method

Abbreviations: TDM – Therapeutic Drug Monitoring; PK – pharmacokinetics; PD – pharmacodynamics; HPLC – high performance liquid chromatography; MS – mass spectrometry; LLOQ – lower limit of quantitation; QC – quality control; DBS – Dried Blood Spot.

ВВЕДЕНИЕ

Терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) используют для повышения индивидуализации фармакотерапии, особенно у групп пациентов с высокой межиндивидуальной вариабельностью фармакокинетических (ФК) параметров [1]. К таким пациентам относят в том числе и новорожденных, для которых лекарственная терапия, особенно препаратов с узким терапевтическим диапазоном, сопряжена с рядом трудностей или не может быть применена в принципе [2, 3].

Особенно часто назначаемыми препаратами для новорожденных являются антибиотики. Около 2,5% доношенных детей получают антибиотикотерапию в первые 3 дня жизни. Однако следует учитывать, что набор различных физиологических и аутоиммунных особенностей у данной группы пациентов влияет на ФК лекарственных препаратов и может привести к неэффективной фармакотерапии и

развитию нежелательных последствий, а скрытые или явные особенности организма диктуют необходимость индивидуального подхода с тенденцией к минимизации воздействий (минимальная доза, минимальное количество введений). Это особенно усложняет применение антибиотиков с узким диапазоном между минимальной терапевтической и токсической концентрациями. Одним из таких препаратов является ванкомицин, который назначается при лечении тяжелых инфекций, вызванных грамположительными бактериями, например золотистым стафилококком (особенно метициллин-резистентными штаммами), коагулазонегативным стафилококком и ампициллин-резистентными видами *Enterococcus* [2, 4].

Некоторые факторы, определяющие внутри- и межиндивидуальную вариабельность, такие как возраст, масса, состояние почек влияют на ФК

и, как следствие, на фармакодинамические (ФД) параметры ванкомицина. Это вызывает необходимость проведения ТЛМ данной группы пациентов, ФК анализа и создание популяционных ФК моделей, в которых учитывают клинически значимые особенности новорожденных и их влияние на ФК ванкомицина [1, 4].

Совокупность особенностей данной группы пациентов не позволяет провести масштабные и полноценные исследования ФК и ТЛМ. Так как стандартные способы отбора биообразцов не оптимальны в силу объективных этических и логистических ограничений у новорожденных и маленьких детей, возникает необходимость разработки и апробации новых подходов, оптимизации ТЛМ, построение ФК моделей и методов сбора биообразцов, в том числе для проведения ТЛМ. Перспективным направлением в данной области можно считать метод «высушенной капли крови», который широко применяют, к примеру, для скрининга наследственных заболеваний у новорожденных [1, 5, 6].

Ранее нами уже был разработан и валидирован метод количественного ВЭЖХ–МС/МС определения ванкомицина в образцах плазмы крови [7] и подготовлены протоколы по сбору, анализу и валидации образцов «высушенной капли крови» [5]. В связи с этим в данном исследовании нами были применены данные методы.

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация методики количественного определения ванкомицина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией в образцах «высушенной капли крови» с использованием новых протоколов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Этическая экспертиза

Дизайн и протоколы исследования, образцы информированного согласия для законных представителей пациентов были приняты, а затем рассмотрены и одобрены на заседании Локального этического комитета Волгоградского государственного медицинского университета (регистрационный № IRB00005839 IORG 0004900 (ONRP)), о чем свидетельствует выписка из протокола № 39 от 28 июня 2022 г.

Химические вещества и реагенты

Для приготовления маточных и стандартных растворов ванкомицина и норванкомицина как внутреннего стандарта использовали: высокоочищенную воду, которую получали в системе Milli-Q, муравьиную кислоту для ВЭЖХ–МС (Scharlab, Испания), ацетонитрил (Scharlab, Испания), а также сухие навески соответствующих сертифицированных стандартов ванкомицина (Servier, Франция) и норванкомицина (Augsburg, Германия, степ. чистоты >95,0%).

Образцы «высушенной капли»

Все 15 образцов «высушенной капли» получали от новорожденных пациентов, которым проводили терапию ванкомицином на базе ГУЗ «Клинической больницы № 5» отдела неонатологии г. Волгограда (Россия). Образцы получали по стандартным протоколам [5].

Отбор проб осуществляли согласно следующему алгоритму:

1. Оформили информированное добровольное согласие законного представителя;
2. Подписали карту капли с идентификатором пациента и датой;
3. Выбрали место проведения пункции на боковой стороне пятки;
4. Подготовили стопу с помощью теплой пеленки;
5. Обработали руки и надели стерильные перчатки;
6. Расположили пятку ниже туловища ребенка и удерживали ее без резкого сгибания лодыжки;
7. За 5 мин до укола *per os* шприцом вводили 30% раствор глюкозы в дозе, указанной на рисунке 1 плюс к этому нутритивное сосание;
8. Обработывали место проведения пункции антисептическим раствором;
9. Повторно вводили пациенту *per os* шприцом 30% раствор глюкозы непосредственно перед уколом;
10. Быстро прокалывали кожу ланцетом и убирали стерильным ватным шариком первую каплю крови;
11. Сразу после укола снова вводили 30% раствор глюкозы *per os* плюс к этому нутритивное сосание;
12. Удерживали место пункции внизу, осторожно надавливая на прилегающую область и проводили взятие крови на бланк фильтровальной бумаги;
13. Держали карту, не касаясь отмеченной области;
14. Осторожно прикоснувшись карточкой фильтровальной бумаги к капле крови, наносили её на карту. Давали впитаться крови, пока круг не заполнялся полностью. После нанесения крови к отмеченной области не прикасались;
15. Давали пятну крови высохнуть в темном месте, без прямых солнечных лучей в течение не менее 4 ч. Во время процесса сушки не допускали нагрева и контакта образцов высушенной капли с другими поверхностями;
16. Запечатывали карту (или части карты) в газонепроницаемый пакет с застежкой–молнией. Хранили не более одной карты в упаковке в холодильнике до отправки в лабораторию при 2–8°C.

Оборудование

Разделение компонентов проводили с использованием ВЭЖХ системы Agilent 1260 (Agilent, США). Анализируемые вещества детектировали с помощью гибридной масс-спектрометрической системы Sciex QTRAP 5500 (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур). Для взвешивания сухих веществ

использовали полумикроаналитические весы Ohaus Explorer EX225/AD (Ohaus, США). В процессе работы также использовали центрифугу 5427 R (Eppendorf, США). Карту GE Whatman FTA WB129242 DMPK-B (США) применяли для архивирования сухих пятен крови. Во время работы системы полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Sciex Analyst 1.6.2.

Приготовление сток-раствора вещества и внутреннего стандарта

Для приготовления стандартных растворов ванкомицина и внутреннего стандарта с концентрацией 1,00 мг/мл взвешивали сухие навески (массой 25 мг) и далее помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки сверхчистой водой.

Приготовление раствора для экстракции образцов «высушенной капли крови»

Отдельно готовили экстрагирующий раствор, который представлял собой смесь воды и метанола в соотношении 1:1 с 0,1 % муравьиной кислотой.

Приготовление рабочих растворов стандартов

Для каждой аналитической серии готовили свежие рабочие растворы стандартов. Конечная концентрация рабочих растворов составила: 10, 20, 50, 100, 200, 500 и 1000 мкг/мл.

Приготовление калибровочных стандартов и образцов контроля качества в образцах «высушенной капли крови»

100 мкл цельной крови переносили в микропробирку на 1,5 мл и добавляли 10 мкл рабочего раствора соответствующей концентрации для получения калибровочных растворов с концентрацией 1, 2, 5, 10, 20, 50 и 100 мкг/мл для ванкомицина. Для образцов контроля качества (КК) 1 (нижний предел количественного определения – НПКО); 7,5 (низкий КК); 35 (средний КК); 75 (высокий КК) мкг/мл для ванкомицина. Далее 20 мкл рабочих растворов наносили на фильтровальную бумагу и сушили в течение 3-х ч.

Пробоподготовка анализируемых проб

Для подготовки образцов «высушенной капли крови» использовали диск диаметром 6 мм из карт, на который специальным устройством наносили образцы и который впоследствии анализировали.

Экстракция образцов «высушенной капли крови»

В пробирку с вырезанным диском добавляли 400 мкл экстракционного раствора. Пробирку центрифугировали при 1000 об/мин в течение 30 мин при 25°C. После 10 мин центрифугирования при 10.000 g аликвоту 350 мкл надосадочной жидкости выпаривали при 45°C в вакуумной центрифуге. Высушенный экстракт собирали

в 100 мкл подвижной фазы А, центрифугировали в течение 10 мин при 10.000 g и 20 мкл супернатанта вводили в систему ВЭЖХ-МС/МС.

Хроматографические и масс-спектрометрические условия

Таким образом, на основе имеющихся в литературе данных и собственных исследований, нами был разработан и валидирован биоаналитический метод анализа ванкомицина в плазме крови человека с применением ВЭЖХ-МС/МС системы, удовлетворяющий требованиям протокола исследования и валидированный в соответствии с руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» и руководством EMEA «Guideline on Bioanalytical Method Validation».

При разработке условий масс-спектрометрической детекции искомых веществ использовали ионы-предшественники (725,3 m/z) и соответствующие им ионы-продукты (88,1 и 387,9 m/z).

Статистическая обработка

Валидацию биоаналитической методики проводили в соответствии с «Руководством по экспертизе лекарственных средств», а также с руководствами U.S. Food and Drug Administration и EMA (European Medicines Agency) по следующим показателям: стабильность, селективность, линейность, правильность, прецизионность, НПКО. Экспериментально рассчитанные концентрации градуировочных стандартов должны лежать в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений (за исключением НПКО, для которых эти значения могут находиться в пределах $\pm 20\%$). А также по специфическим показателям, таким как эффект объема капли, эффект гематокрита, однородность капли по уже разработанным протоколам [8–10]. Обработку полученных данных проводили с использованием программно-статистической среды R 3.6.1 в программе RStudio 1.2, а также специализированного программного обеспечения Sciex Analyst 1.6.2.

При валидации однородности капли сравнивали результаты 2-х уровней концентраций образцов КК на трех различных уровнях гематокрита, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и у края. Анализ проводили в 5 повторностях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не должна была превышать 15%.

Для оценки влияния эффекта объема капли необходимо было провести анализ 3-х разных объемов (10, 40, 70 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 повторностях. При этом относительная погрешность не должна была превышать 15%.

Оценивали также эффект гематокрита на 3-х уровнях (0,3; 0,4; 0,5), при 2 концентрационных

уровнях в 5 повторностях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не должна была превышать 15% от полученных значений при среднем уровне гематокрита.

Уровень согласованности между разработанным ВЭЖХ-МС/МС методом для способа «высушенной капли крови» и традиционным методом ВЭЖХ-МС/МС с преципитацией белков в качестве пробоподготовки исследовали методом Бланда-Алмана. Данный метод позволяет провести сравнение результатов измерений, выполненных двумя разными способами. Его суть состоит в том, что для каждой пары измерений вычисляются разность и среднее значение. Средняя разность, вычисленная для всех пар признаков в исследуемом наборе данных, характеризует систематическое расхождение показателей, наличие которого указывает на неполное соответствие результатов, полученных разными методами, а стандартное отклонение разностей отражает степень разброса результатов.

Средние значения и стандартные отклонения рассчитывали с помощью программы Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США), статистическую обработку результатов исследования проводили в программе GraphPad Prism 6 (США).

Среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD) разницы между двумя совпадающими показаниями рассчитывали для определения эквивалентности двух методов. При этом более 95% рассчитанных средних концентраций между двумя методами должны попадать в пределы $d-2s$ и $d+2s$, чтобы подтвердить пригодность аналитического метода «высушенной капли крови» для анализа образцов пациентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода количественного ВЭЖХ-МС/МС определения ванкомицина включала определение оптимальных параметров хроматографического разделения, а также последующей масс-спектрометрической детекции.

Используя ранее накопленный опыт, были подобраны оптимальные условия хроматографического разделения, которое проводили на колонке Poroshell 120 C18 (4,6×50 мм, 2,7 мкм). Мобильная фаза представляла собой смесь ацетонитрила и воды в соотношении 80:20 при скорости потока 0,3 мл/мин. 0,1% раствор муравьиной кислоты добавляли как в водную, так и в органическую составляющую мобильной фазы. В ходе оптимизации условий хроматографического разделения был выбран изократический режим элюирования [5, 8, 11, 12].

Время удерживания ванкомицина составило 1,63 мин (Рис. 1) при изократическом режиме элюирования.

В качестве метода ионизации использовали электроспрей (ESI). Детекцию ионов проводили в режиме положительной полярности.

При разработке условий масс-спектрометрической детекции искомых веществ использовали ионы-предшественники (725,3 m/z) и соответствующие им ионы-продукты (88,1 и 387,9 m/z).

Разработанная методика подтвердила свою линейность в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/мл (K1 – 1 мкг/мл, K2 – 3 мкг/мл, K3 – 5 мкг/мл, K4 – 10 мкг/мл, K5 – 25 мкг/мл, K6 – 50 мкг/мл, K7 – 80 мкг/мл, K8 – 100 мкг/мл) при использовании взвешенного коэффициента $1/x^2$, при этом $R^2 > 0,99$. Коэффициент вариации (%), рассчитываемый при определении меж- и внутрисуточных точности, не превышал 15% для основного диапазона концентраций.

НПКО методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности приведенных в таблице 1. Селективность валидировали путем анализа 6 холостых образцов и 6 образцов НПКО. Площадь пиков в области времени удерживания аналита не превышала 20% от НПКО (Табл. 1).

Также для метода «высушенной капли крови» было оценено влияние гематокрита, объема капли и её однородности.

Влияние гематокрита оценивали на 3-х уровнях гематокрита (0,3; 0,4; 0,5), для QCL и QCN. При этом полученные концентрации находились в диапазоне от 94,3 до 105,8% от номинальных (Табл. 2).

Для валидации эффекта объема провели анализ 3-х объемов (10, 40, 70 мкл) при среднем уровне гематокрита (0,4), на 2-х уровнях концентрации в 5 повторностях. Относительная погрешность рассчитанных концентраций не превышала 15% от полученных значений при среднем объеме.

При валидации однородности капли сравнили результаты образцов КК при QCL и QCN, полученные при 2-х вариантах выреза капли: из центра капли и у края. Анализ проводили в 5 повторностях. При этом относительная погрешность при сравнении концентраций из образцов, полученных из центрального и краевого выреза, не превышала 15% от номинальных.

Термическую стабильность оценивали при хранении образцов «высушенной капли крови» в течение 14 сут при температуре 22 и 45°C, как потенциально возможные температуры при хранении и транспортировке образцов. Для оценки стабильности использовали образцы «высушенной капли крови» на уровнях QCL и QCN. При этом образцы анализировали в 3-х временных точках – 1, 7 и 14 сут вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации образцов после хранения сравнивали со средними значениями концентраций свежеприготовленных образцов КК. После 14 дней хранения рассчитанные концентрации образцов находились в диапазоне от 85,4–87,5%.

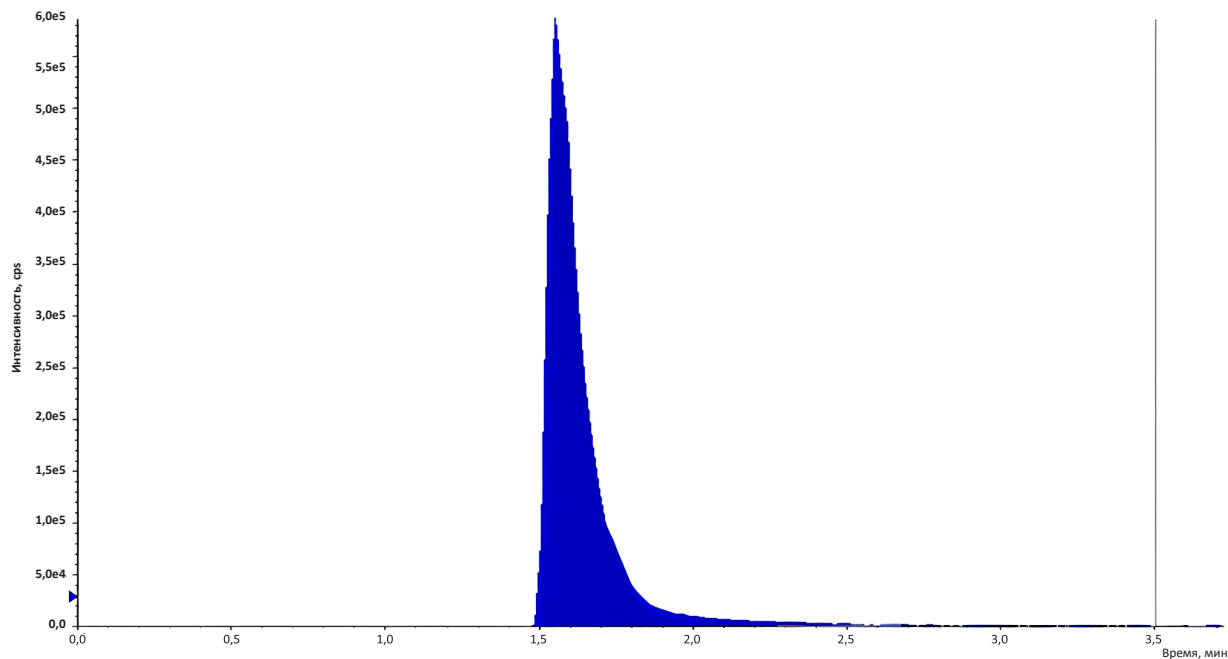


Рисунок 1 – Хромато-масс-спектр ванкомицина в образцах «высушенной капли крови»

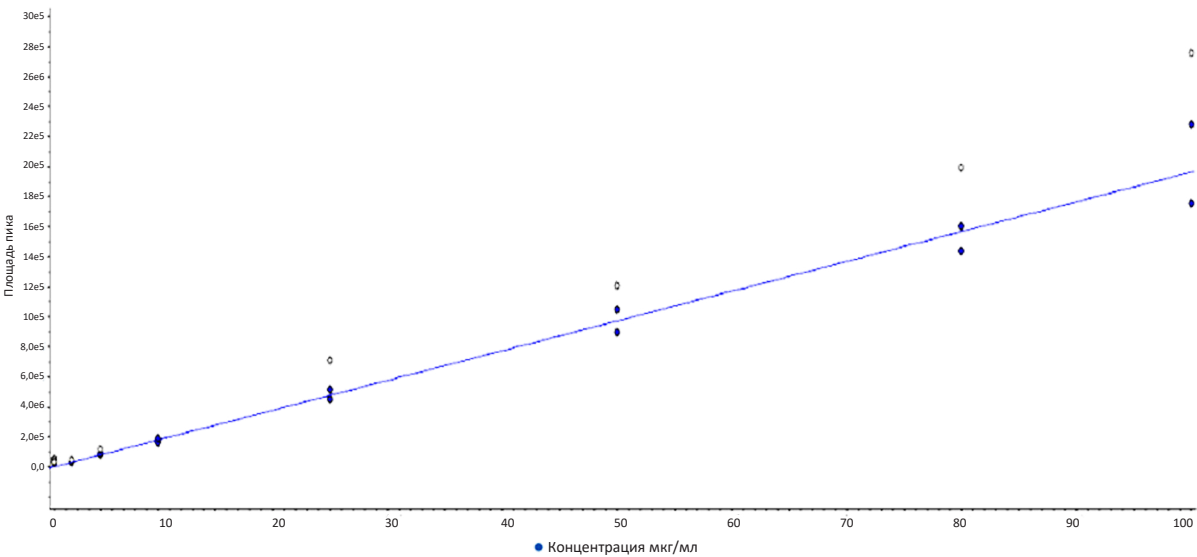


Рисунок 2 – Калибровочная кривая ванкомицина в плазме крови

Таблица 1 – Рассчитанные валидационные характеристики для метода с использованием в качестве пробоподготовки «высушенную каплю крови»

Параметр		Значение			
		НПКО (1 мкг/мл)	Нижний КК (7,5 мкг/мл)	Средний КК (35 мкг/мл)	Верхний КК (75 мкг/мл)
Прецизионность (CV %)	Внутри цикла	2,7	2,1	2,7	3,7
	Между циклами	7,6	4,7	6,9	7,0
Правильность (%)	Внутри цикла	104,6	94,4	101,6	101,8
	Между циклами	91,3	95,1	103,2	107,6
Стабильность (%)		–	85,3	–	87,5
Селективность (%)		2,7	–	–	–
Коэффициент корреляции		0,99			

Примечание: КК – контроль качества.

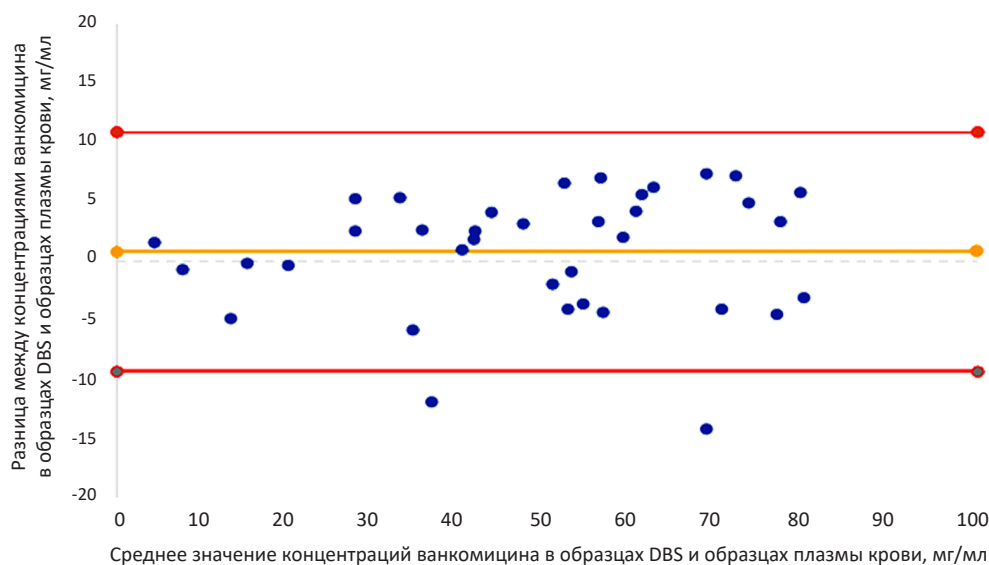


Рисунок 3 – Сравнение двух методов пробоподготовки по Блэнду-Алтману для ванкомицина

Примечание: DBS – высушенная капля крови.

Таблица 2 – Влияние гематокрита на результаты анализа

Гематокрит, %	QC	Номинальная концентрация, мг/мл	Точность, %
0,3	LQC	7,5	94,3
	HQC	75	97,6
0,4	LQC	7,5	95,8
	HQC	75	98,1
0,5	LQC	7,5	95,6
	HQC	75	105,8

Таблица 3 – Влияние объема капли на результаты анализа

Объем капли, мкл	QC	Номинальная концентрация, мг/мл	Точность, %
10	LQC	7,5	105,7
	HQC	75	108,9
40	LQC	7,5	96,4
	HQC	75	104,5
70	LQC	7,5	91,5
	HQC	75	96,4

Таблица 4 – Влияние места выреза на результаты анализа

Место выреза	QC	Номинальная концентрация, мг/мл	Точность, %
Центральный вырез	LQC	7,5	98,3
	HQC	75	103,7
Краевой вырез	LQC	7,5	93,3
	HQC	75	96,5

Для сравнительного исследования использовали образцы «высушенной капли крови», которые получали от новорожденных, находящихся на терапии ванкомицином в ГУЗ «Клинической больницы № 5» (Волгоград, Россия). Сравнивали значения концентраций ванкомицина в образцах «высушенной капли крови» и образцах плазмы (Рис. 3).

М и SD разницы между двумя совпадающими показаниями рассчитывали для определения эквивалентности двух методов. Результаты исследования показали, что более 95% рассчитанных средних концентраций находятся в пределах $d-2s$ и $d+2s$, которые соответствовали значениям $-10,2$ и $12,2$, что подтверждает пригодность разработанного метода для анализа.

ОБСУЖДЕНИЕ

ТЛМ представляет собой алгоритмы измерения количества конкретных лекарств через определенные промежутки времени для поддержания постоянной концентрации в кровотоке пациента с целью оптимизации и индивидуализации схем дозирования. Данный подход применяют для мониторинга лекарств с узким терапевтическим диапазоном, выраженной ФК вариабельностью, или для тех, целевые концентрации которых трудно контролировать. Для лекарственных средств с четкой зависимостью «доза-эффект» ТЛМ может существенно повысить эффективность и безопасность лечения, снизить затраты в социально-медицинской сфере.

В настоящее время ТЛМ у новорожденных не относят к рутинной практике. Крупные клинические центры, которые имеют возможности для его проведения, для оценки целевой экспозиции, чаще всего ограничиваются определением C_{trough} ванкомицина [4].

Общепризнанной целью проведения ТЛМ ванкомицина является оценка системной экспозиции по определению C_{trough} , как остаточной концентрации перед введением следующей дозы препарата. Согласно международным рекомендациям, целевая C_{trough} ванкомицина должна находиться на уровне $10-20$ мг/л и быть выше минимально ингибирующая концентрация (МИК) [1]. Рекомендованный диапазон C_{trough} позволяет достигать необходимых ФД показателей – ПФК24 / МИК [4].

Однако основной проблемой, которая стоит перед врачами, является необходимость оценки возможности и точности экстраполяции целевых ФК и ФД показателей ($C_{trough}=10-20$ мг/л и ПФК24 / МИК >400) [1].

Согласно международным рекомендациям, целевой уровень C_{trough} в настоящее время составляет $15-20$ мг/л и отношения ПФК24 / МИК >400 . Ряд исследований в отдельных популяциях, указывает на высокую вариабельность параметров ФК, при этом целевые значения C_{trough} $15-20$ мг/л и отношение ПФК2 / МИК >400 в них не достигали в среднем $30-33\%$ исследуемой популяции [13, 14].

На сегодняшний день ТЛМ ванкомицина предполагает дополнительно к измерению равновесной остаточной концентраций (C_{trough}) расчет площади под ФК кривой за 24 ч (ПФК24), с последующей оценкой целевого соотношения ФК / ФД, которое выражается как отношение ПФК24 к минимальной ингибирующей концентрации (МИК) ПФК24 / МИК >400 [13, 15, 16]

Новорожденные и пациенты детского возраста чувствительны не только к тем или иным ксенобиотикам, но и подвержены различным рискам вирусных, бактериальных или грибковых инвазий, многие из которых значительно изменяют функционирование систем метаболизма и выведения. Неонатальный возраст может являться фактором риска развития нефротоксичности, значимость которого увеличивается пропорционально недоношенности.

В проведенных ранее исследованиях, с применением математического моделирования и ТЛМ у пациентов с нарушением функции почек и с инфекционными осложнениями было доказано, что их наличие значительно влияет на ФК параметры. Так было продемонстрировано, что при стандартном подходе к дозированию в 65% случаев не удаётся достичь целевых значений для C_{trough} $15-20$ мкг/мл через 48 ч от начала терапии. Это свидетельствует о высокой вариабельности параметров ФК ванкомицина, особенно в группе пациентов с нарушениями функции почек [17].

В исследовании Kim J. и соавт. было показано, что у новорожденных с адекватной функцией почек при режиме дозирования от 9 до 12 мг/кг внутривенно каждые 8 ч вероятность достижения целевых концентраций ванкомицина низкая [18].

Для оценки всех этих параметров и оптимизации ТЛМ существуют различные математические модели, которые позволяют предусмотреть неизвестные ФК параметры. Известны как простые однокомпарментные модели – «медицинские калькуляторы», так и более сложные – «калькуляторы доз», применение которых позволяет корректировать режим дозирования для достижения C_{trough} в диапазоне $15-20$ мкг/мл [1, 19].

Стоит выделить, что международные рекомендации по режиму дозирования ванкомицина не всегда оптимальны. Так у недоношенных пациентов данные рекомендации являются недостаточными для получения минимальных концентраций в сыворотке от 10 до 20 мкг/мл [20].

Исследование ФК / ФД для уже используемых в клинической практике антибиотиков необходимы для оптимизации режимов дозирования, в том числе для предупреждения развития резистентности. Поскольку результаты исследований, которые проводятся на взрослых, часто неприменимы для новорожденных локальный ТЛМ представляет не только полезный инструмент оптимизации терапии, но и ценный источник данных, которые могут иметь не только прикладное значение, но и носить фундаментальный характер. Отдельными

вопросами, которые необходимо решить, являются методы отбора биообразцов и оптимизация их количества, что связано с возрастом и размерами пациентов [21].

Большинство рекомендаций разработаны для взрослых пациентов [1, 3, 4, 11]. Что касается новорожденных детей, то стандартизации процесса мешают меньшее количество исследований, а значит и значительно меньшее количество данных для анализа, вариабельность ФК показателей, более сложное моделирование с необходимостью учёта большего количества ковариат [4].

Для современной разработки руководств, инструкций и протоколов требуются дополнительное проведение ФК исследований, построение математических моделей и внедрение алгоритмов ТЛМ. Что и вызывает трудности, так как исследования и ТЛМ помимо финансирования и прохождения большого количества бюрократических процедур требуют решения многих задач технического характера. [6] Так, например, не решен вопрос с определением оптимального количества биообразцов; кровь, из которой впоследствии получают плазму или сыворотку отбирают из вены, но ее количество и техническая сложность проведения значительно осложняют процесс разработки нормативной документации. ТЛМ антибиотиков у новорожденных и недоношенных детей практикуют редко именно из-за сложностей с отбором крови. [1]

Обозначенное выше указывает на необходимость разработки эффективных и менее инвазивных методов получения биообразцов от новорожденных и пациентов детского возраста. Одним из них является метод «высушенной капли крови» (Dried Blood Spot, DBS), который является наиболее удобным способом получения биоматериала по сравнению со стандартными [6]. Полученные биообразцы с помощью данного метода обладают большей стабильностью, их удобнее транспортировать и хранить [4, 22]. Данные преимущества не только раскрывают целесообразность использования метода «высушенной капли крови» для проведения ТЛМ в случаях с новорожденными или пациентами детского возраста, но и определяют необходимость проведения исследований в данном направлении, например при использовании ванкомицина при лечении заболеваний у новорожденных и пациентов детского возраста [1].

Получение биообразцов для проведения пробоподготовки и анализа методом «высушенной капли крови» требует дополнительной оптимизации. Используемые в настоящее время валидационные протоколы биоаналитических методик, которые описаны в руководствах для традиционных образцов, не учитывают всех необходимых аспектов новой технологии «высушенной капли» и усложняют последующее применение метода в ТЛМ. На результаты анализа могут влиять специфические характеристики, такие как гематокрит, гомогенность капли и её размер, что требует определения новых подходов к разработке и валидации методов качественного и количественного определения [4, 23].

Информативность и прогностическая ценность ТЛМ при проведении обоснованной, с точки зрения фармакокинетики, индивидуализации при подборе режима дозирования определяются надежностью используемых аналитических методов, применяемых для количественного определения лекарственных препаратов в биологических образцах [24]. Для данных целей необходимо использовать селективные и высокочувствительные аналитические методы, таких как ВЭЖХ–МС/МС [25, 26].

ФК исследования и ТЛМ требуют большого количества биообразцов, что сложно осуществить при работе с новорожденными [27]. Вследствие этого возникает необходимость применения менее инвазивных способов пробоподготовки для последующего внедрения их в алгоритмы ТЛМ. Одним из перспективных подходов осуществления подобного мониторинга у новорожденных может стать метод «высушенной капли крови». Необходимым направлением, без которого внедрение новых методов мониторинга и оптимизации фармакотерапии у новорожденных будет затруднительно, является разработка высокоселективных и специфичных методов качественного и количественного определения ванкомицина с использованием метода «высушенной капли крови» [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одними из важных результатов данного исследования стало определение оптимальных условий количественного анализа с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрической детекции определения ванкомицина в образцах «высушенной капли крови». В результате исследования удалось провести валидацию методики определения ванкомицина в образцах «высушенной капли крови». Доказана тождественность результатов количественного определения ванкомицина при стандартных и предлагаемых вариантах пробоподготовки.

Обозначенное выше позволяет рекомендовать метод «высушенной капли крови» для проведения ТЛМ ванкомицина и дополнительных исследований фармакокинетики у данной группы пациентов, что позволит провести оптимизацию и приблизить проводимую фармакотерапию новорожденных к идеалам персонализированной медицины. Разработка подобных методов позволяет решить важную практическую задачу в области исследования фармакокинетики новорожденных, что немаловажно для клинической фармакологии поскольку проведение клинических исследований у маленьких пациентов осложнено в том числе этими причинами. Разработка методов качественного и количественного определения различных веществ в крови, располагая биообразцами минимального размера, существенно расширит возможности проведения клинических исследований, что безусловно поспособствует развитию не только общей и клинической фармакологии, но и существенно усилит фармакотерапию.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Гранта РНФ по теме: «Разработка популяционной фармакоэкономической модели для оценки прогностической значимости факторов вариабельности параметров фармакокинетики антибактериальных препаратов у новорождённых», в рамках соглашения от 10 июня 2022 года № 11 (на проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований) между Комитетом экономической политики и развития Волгоградской области, Российским научным фондом и федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также руководителем научного коллектива.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ВКЛАД АВТОРОВ

И.С. Аникеев, Т. Е. Заячникова, Ю.С. Казьмина – концепция, планирование статьи, обзор литературных источников, сбор материалов, написание и редактирование статьи; В.И. Петров, А.В. Стрыгин, Д.В. Куркин – разработка дизайна исследования, редактирование и окончательное утверждение статьи. Все авторы сделали эквивалентный и равнозначный вклад в подготовку публикации. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Толкачев Б.Е., Петров В.И., Заячникова Т.Е., Стрыгин А.В., Аникеев И.С., Доценко А.М. Терапевтический лекарственный мониторинг ванкомицина у новорожденных: проблемы и перспективы // Лечебное дело. – 2021. – № 2. – С. 17–24. DOI: 10.24412/2071-5315-2021-12327
2. Pham J.T. Challenges of vancomycin dosing and therapeutic monitoring in neonates // J Pediatr Pharmacol Ther. – 2020. – Vol. 25, No. 6. – P. 476–484. DOI: 10.5863/1551-6776-25.6.476
3. Туфанова О.С., Касимова А.Р., Божкова С.А. Оценка эффективности и безопасности фармакотерапии ванкомицином у пациентов с ортопедической инфекцией с помощью методики терапевтического лекарственного мониторинга // Безопасность и риск фармакотерапии. – 2022. – Т. 10, № 2. – С. 128–138. DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-2-128-138
4. Rybak M.J., Lomaestro B.M., Rotschafer J.C., Moellering R.C. Jr., Craig W.A., Billeter M., Dalovisio J.R., Levine D.P. Therapeutic monitoring of vancomycin in adults summary of consensus recommendations from the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists // Pharmacotherapy. – 2009. – Vol. 29, No. 11. – P. 1275–1279. DOI: 10.1592/phco.29.11.1275
5. Петров В.И., Аникеев И.С., Заячникова Т.Е., Стрыгин А.В., Доценко А.М. Адаптация метода «высушенной капли крови» для проведения терапевтического лекарственного мониторинга // Фармация и фармакология. – 2022. – Т. 10, № 4. – С. 331–342. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-4-331-342
6. Толкачев Б.Е., Стрыгин А.В., Аникеев И.С. Терапевтический лекарственный мониторинг с использованием метода «высушенной капли»: проблемы и перспективы // Лекарственный вестник. – 2021. – Т. 15, № 3 (83). – С. 13–20.
7. Аникеев И.С., Осадченко Н.А., Басаргина П.С., Жуковская Ю.А., Милеева Ю.С. Разработка высокочувствительного хромато-масс-спектрометрического метода определения ванкомицина и пиперациллина в плазме крови // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2018. – С. 522.
8. Петров В.И., Аникеев И.С., Заячникова Т.Е., Стрыгин А.В., Доценко А.М., Стрыгина А.О. Разработка и валидация количественного ВЭЖХ-МС/МС метода определения ванкомицина в плазме крови // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2022. – Т. 19, № 4. – С. 128–134. DOI: 10.19163/1994-9480-2022-19-4-128-134
9. Li Y., Yin L., Li Y., Sun Z., Zhao X., Gao M., Wang H. Therapeutic drug monitoring of vancomycin and voriconazole by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method // Chemical Research in Chinese Universities. – 2017. – Vol. 33. – P. 339–342. DOI: 10.1007/s40242-017-7051-8
10. Usman M., Hempel G. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA) // Springerplus. – 2016. – Vol. 5. – Art. ID: 124. DOI: 10.1186/s40064-016-1778-4
11. Matsumoto K., Takesue Y., Ohmagari N., Mochizuki T., Mikamo H., Seki M., Takakura S., Tokimatsu I., Takahashi Y., Kasahara K., Okada K., Igarashi M., Kobayashi M., Hamada Y., Kimura M., Nishi Y., Tanigawara Y., Kimura T. Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of vancomycin: a consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring // J Infect Chemother. – 2013. – Vol. 19, No. 3. – P. 365–380. DOI: 10.1007/s10156-013-0599-4
12. Schmitt V., Szeitz A., Klassen T.L., Häfeli U.O. An ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of vancomycin requiring only 2 µl of rabbit serum // Am J Anal Chem. – 2017. – Vol. 09 (08). – P. 553–563. DOI: 10.4236/ajac.2017.89040
13. Bel Kamel A., Bourguignon L., Marcos M., Ducher M., Goutelle S. Is trough concentration of vancomycin predictive of the area under the curve? A clinical study in elderly patients // Ther Drug Monit. 2017. – Vol. 39, No. 1. – P. 83–87. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000359
14. Reilly A.M., Ding M.X., Rower J.E., Kiser T.H. The effectiveness of a vancomycin dosing guideline in the neonatal intensive care unit for achieving goal therapeutic trough concentrations // J Clin Pharmacol. – 2019. – Vol. 59, No. 7. – P. 997–1005. DOI: 10.1002/jcph.1392
15. Moise-Broder P.A., Forrest A., Birmingham M.C.,

- Schentag J.J. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections // *Clin Pharmacokinet.* – 2004. – Vol. 43, No. 13. – P. 925–942. DOI: 10.2165/00003088-200443130-00005
16. Плотников Г.П., Кудрявцев А.Н., Клеузович А.А., Чижов А.Г., Пономарев А.А., Ларин С.С., Литвин Е.А., Анастасевич Л.А. Терапевтический лекарственный мониторинг антибиотиков: практическое значение в терапии сепсиса // *Вестник анестезиологии и реаниматологии.* – 2022. – Т. 19, № 6. – С. 62–71. DOI: 10.21292/2078-5658-2022-19-6-62-71
 17. Jacqz-Aigrain E., Leroux S., Thomson A.H., Allegaert K., Capparelli E.V., Biran V., Simon N., Meibohm B., Lo YL., Marques R., Peris J.E., Lutsar I., Saito J., Nakamura H., van den Anker J.N., Sharland M., Zhao W. Population pharmacokinetic meta-analysis of individual data to design the first randomized efficacy trial of vancomycin in neonates and young infants // *J Antimicrob Chemother.* – 2019. – Vol. 74, No. 8. – P. 2128–2138. DOI: 10.1093/jac/dkz158
 18. Kim J., Walker S.A., Iaboni D.C., Walker S.E., Elligsen M., Dunn M.S., Allen V.G., Simor A. Determination of vancomycin pharmacokinetics in neonates to develop practical initial dosing recommendations // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58, No. 5. – P. 2830–2840. DOI: 10.1128/AAC.01718-13
 19. Абаимов Д.А., Сариев А.К., Носкова Т.Ю., Шведков В.В., Ширяева М.В., Стырова Е.Ю., Прохоров Д.И., Сейфулла Р.Д. Современные технологии в терапевтическом лекарственном мониторинге // *Эpilepsия и пароксизмальные состояния.* – 2013. – Т. 5, № 2. – С. 31–41.
 20. Ringenberg T., Robinson C., Meyers R., Degnan L., Shah P., Siu A., Sturgill M. Achievement of therapeutic vancomycin trough serum concentrations with empiric dosing in neonatal intensive care unit patients // *Pediatr Infect Dis J.* – 2015. – Vol. 34, No. 7. – P. 742–747. DOI: 10.1097/INF.0000000000000664
 21. Verhoven S.M., Groszek J.J., Fissell W.H., Seegmiller A., Colby J., Patel P., Verstraete A., Shotwell M. Therapeutic drug monitoring of piperacillin and tazobactam by RP-HPLC of residual blood specimens // *Clin Chim Acta.* – 2018. – Vol. 482. – P. 60–64. DOI: 10.1016/j.cca.2018.03.021
 22. Westra N., Proost J.H., Franssen C.F.M., Wilms E.B., van Buren M., Touw D.J. Vancomycin pharmacokinetic model development in patients on intermittent online hemodiafiltration // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 14, No. 5. – P. e0216801. DOI: 10.1371/journal.pone.0216801
 23. Al-Ghazawi M., El Huda Daoud N., Hadidi K.A., Alzweiri M., Aburuz S. Determination of vancomycin content in dried blood spots for therapeutic drug monitoring // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* – 2021. – Vol. 78, No. 1. – P. 3–10. DOI: 10.32383/APPDR/132021
 24. Wilhelm A.J., den Burger J.C., Swart E.L. Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: progress to date and future directions // *Clin Pharmacokinet.* – 2014. – Vol. 53, No. 11. – P. 961–973. DOI: 10.1007/s40262-014-0177-7
 25. Liu M., Yang ZH., Li G.H. A novel method for the determination of vancomycin in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in patients with diabetic foot infections // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23, No. 11. – P. 2939. DOI: 10.3390/molecules23112939
 26. Муратов К.М., Морозова Т.Е. Сравнение показателей фармакокинетики ванкомицина, полученных на основании терапевтического лекарственного мониторинга и методом математического моделирования // *Фармакогенетика и фармакогеномика.* – 2018. – № 2. – С. 27–27. DOI: 10.24411/2588-0527-2018-10011
 27. Rybak M.J., Le J., Lodise T.P., Levine D.P., Bradley J.S., Liu C., Mueller B.A., Pai M.P., Wong-Beringer A., Rotschafer J.C., Rodvold K.A., Maples H.D., Lomaestro B.M. Executive summary: therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a revised consensus guideline and review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists // *Pharmacotherapy.* – 2020. – Vol. 40, No. 4. – P. 363–367. DOI: 10.1002/phar.2376
 28. Kang J.S., Lee M.H. Overview of therapeutic drug monitoring // *Korean J Intern Med.* – 2009. – Vol. 24, No. 1. – P. 1–10. DOI: 10.3904/kjim.2009.24.1.1

АВТОРЫ

Петров Владимир Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; главный внештатный специалист – клинический фармаколог Министерства здравоохранения РФ, заслуженный деятель науки РФ, заслуженный врач РФ. ORCID ID: 0000-0002-0258-4092. E-mail: brain@sprintnet.ru

Аникеев Иван Сергеевич – ассистент кафедры фундаментальной медицины и биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заведующий лабораторией фармакокинетики НЦИЛС ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-9384-4338. E-mail: anikeivan@yandex.ru

Заячникова Татьяна Евгеньевна – кандидат медицинских наук, доцент, профессор кафедры педиатрии и неонатологии Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования

ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6758-4686. E-mail: guz5deti@mail.ru

Стрыгин Андрей Валерьевич – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фундаментальной медицины и биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заместитель директора НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-6997-1601. E-mail: drumsav@mail.ru

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; старший научный сотрудник лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых систем НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: strannik986@mail.ru

Казьмина Юлия Сергеевна – ассистент кафедры фундаментальной медицины и биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-3324-3351. E-mail: ev8278@mail.ru

УДК 615.277.3



Противоопухолевая активность трех новых производных азолоазинов на модели ортотопической трансплантации клеток рака молочной железы человека мышам

А.Х. Хумаири^{1,2}, Д.Л. Сперанский¹, В.В. Новочадов³,
С.В. Поройский¹, Н.В. Чердынцева⁴, В.В. Удут²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

² Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634028 Россия, г. Томск, пр-т Ленина, д. 3

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный университет», 400062, Россия, г. Волгоград, пр-т Университетский, д. 100

⁴ Научно-исследовательский институт онкологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», 634009, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5

E-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com

Получена 18.07.2023

После рецензирования 25.09.2023

Принята к печати 10.10.2023

Рак молочной железы (РМЖ) относится к наиболее распространенным видам злокачественных опухолей, что делает чрезвычайно актуальными научные исследования в этой области. Трудности химиотерапии РМЖ стимулируют поиск новых препаратов для лечения этой нозологии. Одними из перспективных в этом плане могут быть производные имидазотриазина и имидазотетразина, которые являются аналогами противоопухолевого препарата темозоламида. **Цель.** Оценить противоопухолевую активность трех новых производных азолоазинов в ксенотенной модели рака молочной железы на мышах *in vivo*.

Материалы и методы. Проведено исследование на ксенотенной модели РМЖ. После иммуносупрессии азатиоприном 48 белым мышам BALB/c вводили в основание соска молочной железы клетки линии MCF-7, тестируемые производные и препарат сравнения эпирубицин в дозах $1/2 IC_{50}$ и $1/10 IC_{50}$ однократно. Проводили мониторинг массы тела мышей, по завершении эксперимента на 15-е сут оценивали относительный объем опухолевой ткани и проводили гистологическое исследование.

Результаты и обсуждение. Среди трех исследуемых соединений имидазотетразин 1 продемонстрировал наиболее обнадеживающие результаты: прекращение потери массы тела мышей, вызванное введением опухолевых клеток, и сокращение объема опухоли на 15-е сут эксперимента до 50,6% от аналогичного в контроле при использовании дозы $1/10 IC_{50}$, до 39,2% – при использовании дозы $1/2 IC_{50}$, что значительно превышало значения препарата сравнения эпирубина и значения в контрольной группе. При гистологическом исследовании признаки распространения и сохранения жизнеспособности опухолевых клеток линии MCF-7 после его введения были минимальными, величина гистологического индекса злокачественности снижалась на 9,3% от значения в контроле.

Заключение. Среди тестируемых производных азолоазинов, 3-циклогексил-4-оксоимидазо[5,1-d][1,2,3,5]тетразин-8-N-пиперидинилкарбоксамид является безусловным лидером, вызывающим торможение роста опухоли в ксенотенной модели *in vivo*.

Ключевые слова: имидазотриазин; имидазотетразин; рак молочной железы; клеточная линия MCF-7; мышинные модели

Список сокращений: РМЖ – рак молочной железы; ЯМР – ядерно-магнитный резонанс; MCF-7 – клеточная линия РМЖ человека; BALB/c – генетическая линия белых лабораторных мышей; IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования; G1-G3 – система морфологических критериев определения степени злокачественности.

Для цитирования: А.Х. Хумаири, Д.Л. Сперанский, В.В. Новочадов, С.В. Поройский, Н.В. Чердынцева, В.В. Удут. Противоопухолевая активность трех новых производных азолоазинов на модели ортотопической трансплантации клеток рака молочной железы человека мышам. *Фармация и фармакология*. 2023;11(4):291-300. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-291-300

© А.Х. Хумаири, Д.Л. Сперанский, В.В. Новочадов, С.В. Поройский, Н.В. Чердынцева, В.В. Удут, 2023

For citation: A.H. Al-Humairi, D.L. Speransky, V.V. Novochadov, S.V. Poroisky, N.V. Cherdynseva, V.V. Udut. Antitumor activity of three new azoloazine derivatives in orthotopic transplantation model of human breast cancer cells into mice. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(4):291-300. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-291-300

Antitumor activity of three new azoloazine derivatives in orthotopic transplantation model of human breast cancer cells into mice

A.H. Al-Humairi^{1,2}, D.L. Speransky¹, V.V. Novochadov³,
S.V. Poroisky¹, N.V. Cherdyntseva⁴, V.V. Udut²

¹ Volgograd State Medical University,

1, Pavshih Borcov Sq., Volgograd, Russia, 400131

² Research institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg,

Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,

3, Lenin Ave., Tomsk, Russia, 634028

³ Volgograd State University,

100, Universitetskiy Ave., Russia, 400062

⁴ Research Institute of Oncology, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,

5, Kooperativnyj Lnu, Tomsk, Russia, 634009

E-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com

Received 18 July 2023

After peer review 25 Sep 2023

Accepted 10 Oct 2023

Breast cancer (BC) is one of the most common types of malignant tumors, which makes scientific research in this area extremely relevant. The difficulties of breast cancer chemotherapy stimulate the search for new drugs to treat this nosology. Derivatives of imidazotriazine and imidazotetrazine, which are analogues of the antitumor drug temozolamide, can be ones of the promising drugs in this regard.

The aim of the work was to evaluate the antitumor activity of three new azoloazine derivatives in a xenogeneic breast cancer model in mice *in vivo*.

Materials and methods. A study was conducted on a xenogeneic model of BC. After the immunosuppression with azathioprine, 48 white BALB/c mice were injected with MCF-7 cells, test derivatives, and the reference drug epirubicin at doses of 1/2 IC_{50} and 1/10 IC_{50} , into the base of the mammary gland once. The body weight of the mice was monitored; on the 15th day, at the end of the experiment, the relative volume was assessed.

Results and discussion. Among the three compounds studied, imidazotetrazine 1 showed the most encouraging results: stopping the loss of body weight in the mice caused by the administration of tumor cells, and reducing the tumor volume on the 15th day of the experiment to 50.6% of that in the control when using a dose of 1/10 IC_{50} , up to 39.2% – when using a dose of 1/2 IC_{50} , which significantly exceeded the values of the reference drug epirubicin and the values in the control group. In the histological examination, the signs of spread and preservation of tumor cells viability of the MCF-7 line after its administration were minimal, the value of the histological malignancy index decreased by 9.3% of the control value.

Conclusion. Among the tested azoloazine derivatives, 3-cyclohexyl-4-oxoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-N-piperidinylcarboxamide is the undisputed leader, causing inhibition of the tumor growth in a xenogeneic model *in vivo*.

Keywords: imidazotriazine; imidazotetrazine; breast cancer; MCF-7 cell line; mouse models

Abbreviations: BC – breast cancer; NMR – nuclear magnetic resonance; MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) – human breast cancer cell line; BALB/c – genetic line of white laboratory mice; IC_{50} – concentration of half-maximal inhibition; G1-G3 – system of morphological criteria for determining the degree of malignancy.

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования на настоящий момент являются не только одной из основных причин смертности в мире, но и тревожат специалистов непрерывным ростом заболеваемости, крайней изменчивостью и резистентностью к различным видам лечения. Среди них рак молочной железы (РМЖ) относится к самому распространенному виду злокачественных опухолей у женщин [1–3]. Он выявляется в 1/8 всех вновь выявляемых случаев опухолей и определяет у женщин 14% онкологической смертности [4]. По глобальной статистике 2020 года РМЖ был выявлен у 2,3 млн. человек, а 685 тыс. от него скончались [5]. Генетическое и морфологическое многообразие

РМЖ, трудности его первичной диагностики и высокая резистентность ряда разновидностей к химиотерапии в итоге не может удовлетворять клинических онкологов в современном арсенале химиотерапевтических средств для его лечения. Особенно пессимистическими являются результаты противоопухолевой терапии метастатического РМЖ [6–9].

Все перечисленные моменты определяют настоятельную необходимость и делают чрезвычайно актуальными исследования в области разработки новых химиотерапевтических средств, которые справлялись бы с РМЖ [10, 11].

Исходя из вышеизложенных позиций, мы сосредоточили наше внимание на изучении

производных имидазотетразина и имидазотриазина, которые обладают алкилирующим действием и используются в качестве противоопухолевых средств, в том числе РМЖ, уже более 40 лет. Наиболее известным из них является темозоломид, который доказал свою клиническую эффективность при лечении лимфом, опухолей головного мозга и метастатической меланомы. К сожалению, на современном этапе, многие опухоли резистентны к этому препарату или к нему очень быстро развивается химиорезистентность [12, 13]. На сегодняшний день синтезировано более 30 новых производных имидазотетразина и имидазотриазина, перспективных для использования в качестве противоопухолевых средств [14–16].

В исследовании выдвигается гипотеза о возможной противоопухолевой активности новых производных азолазинов в ксеногенной модели РМЖ на мышах.

Данный этап *in vivo* является обязательным для всех доклинических исследований потенциальных противоопухолевых соединений, поскольку именно моделирование рака у лабораторных животных позволяет в деталях изучить биологию злокачественного роста, в доказательном формате внести предложения по совершенствованию диагностических и терапевтических стратегий. Среди существующих моделей ортотопическая мышь характеризуется трансплантацией опухолевых клеток или фрагментов в том же анатомическом участке, где обычно развивается опухоль. Эта модель рака широко используется на практике [17, 18], поскольку позволяет весьма точно воспроизводить взаимоотношения со стромальными и сосудистыми клетками, обеспечивать микроокружение, которое играет решающую роль в развитии опухолевых клеток.

ЦЕЛЬ. Оценить противоопухолевую активность трех новых производных азолазинов на ксеногенной модели рака молочной железы у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестируемые соединения

Для оценки потенциальных противоопухолевых свойств были проанализированы три производных азолазинового ряда – 3-циклогексил-4-оксоимидазо[5,1-*d*][1,2,3,5]тетразин-8-*N*-пиперидинилкарбоксамид (имидазотетразин **1**), диэтиловый эфир 4-аминоимидазо[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3,8-дикарбоновой кислоты (имидазотриазин **2**) и 4-амино-8-этокси-карбонилимидазо[5,1-*c*][1,2,4]триазин-3-*N*-(*p*-толуил)карбоксамид (имидазотриазин **3**), синтезированные в Уральском федеральном университете имени первого Президента России Б.Н. Ельцина в соответствии с описанными методиками [19, 20]. Проведенный ЯМР анализ подтвердил высокую химическую чистоту полученных соединений. В качестве препарата

сравнения использовали эпирубицин, как препарат, для которого хорошо известны токсикологические эффекты и активность в мышинных моделях [21]. Соединения 1–3 были выбраны для исследования из 11 кандидатов по результатам ранее проведенного определения минимальной половинной ингибирующей концентрации IC_{50} в тесте на цитотоксичность *in vitro* в культуре клеток MCF-7 [22].

Этическая экспертиза

Исследование проведено в соответствии с биоэтическими нормами, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Дизайн экспериментального исследования после экспертизы был одобрен Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 2021/049 от 27 мая 2021 года). Все манипуляции с лабораторными животными осуществляли исключительно лица, имеющие высшее биологическое или медицинское образование.

Лабораторные животные и их содержание

Работа выполнена на 48 мышах-самках BALB/c, полученных из питомника лабораторных животных Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». Перед моделированием метастатического РМЖ животные прошли необходимые сертификационные процедуры и вводный карантин. Содержание животных осуществляли в стандартных условиях вивария Центра инновационных лекарственных средств Волгоградского государственного медицинского университета (Россия) в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)»¹. Животных содержали в пластиковых клетках по 5 особей на подстиле из опилок при свободном доступе к воде и корму с заменой того и другого ежедневно. Температуру воздуха в виварии поддерживали в пределах 20–26°C, относительную влажность находилась в пределах 30–70%, реализовывали

¹ Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (вместе с «СП 2.2.1.3218-14. Санитарно-эпидемиологические правила...»); зарегистрировано в Минюсте России 31.10.2014 № 34547). – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_155631/

12-часовой световой цикл при совмещенном (естественное+люминесцентное) типе освещения. Бактерицидную обработку воздуха производили стационарными бактерицидными установками непрерывно.

Дизайн экспериментального исследования

Основная экспериментальная модель настоящего исследования – ортотопическая имплантация раковых клеток подкожно под сосок в жировую подушечку молочной железы, которая имитирует метастатические стадии и распадающийся РМЖ в клинике. Место и техника инъекции вместе со специфическими свойствами выбранной линии клеток РМЖ в значительной степени определяет динамику поведения трансплантированных клеток в тканях мышей [18].

Чтобы вызвать временную иммуносупрессию белым мышам линии BALB/c вводили внутривентриально азатиоприн из расчета 1 мг/кг массы тела трехкратно: за 3 ч до инъекции опухолевых клеток, через 24 и 48 ч после нее. На основном этапе проводили ортотопическую трансплантацию опухоли, для чего 48 мышам (по 6 животных в каждой группе) вводили в основание соска молочной железы по 10^6 клеток РМЖ человека линии MCF-7 в 0,2 мл стерильного физиологического раствора. Для уменьшения прививочной дозы использовали в качестве носителя Матригель (Corning, США) [23]. Всех животных с привитыми клетками линии MCF-7 делили на 8 групп (табл. 1).

Для изучения спектра противоопухолевой активности использовали две дозы вещества ($1/2 C_{50}$ и $1/10 IC_{50}$). Выбор доз тестируемых производных был обоснован нашими предыдущими исследованиями их цитотоксической и генотоксической активностью. Вещества вводили однократно внутривентриально в 0,2 мл физиологического раствора через 72 ч после инъекции опухолевых клеток, в контрольной группе использовали только стерильный физиологический раствор.

Каждые трое суток мышей взвешивали, визуально контролировали область инъекции.

Выведение животных из эксперимента проводили на 15-е сут передозировкой тилетамина в дозе 200 мг/кг массы внутривентриально. Эвтаназия мышей осуществлялась в помещении, где не содержались другие животные, утилизация трупов производилась ответственным лицом.

После эвтаназии забирали участки подкожной клетчатки брюшной стенки, куда были инъектированы опухолевые клетки, а также аналогичные участки с противоположной стороны. При вырезке материала рассчитывали общий объем сосочка и его основания (mm^3). За относительный объем опухолевой ткани принимали разницу между описанной величиной для интактных и инъектированных молочных желез.

Материал помещали в забуференный 10%-ный раствор формалина для последующего гистологического исследования с помощью аппарата

для проводки Microm STP 420 (Microm, Германия), модульную систему заливки Leica EG 1160 (Leica, Германия), ротационного микротом Leica RM 2255 (Leica, Германия), коверстейнера Dako (Dako, Дания), иммуногистостейнера Dako Link 48 (Dako, Дания), микроскопа Leica DM 6000B с цифровой камерой Leica DFC50C (Leica, Германия). Для визуализации и морфометрического исследования клеток и тканей использовали возможности классической световой и флуоресцентной микроскопии. Имидж-анализ проводили с помощью программы «ImageJ» (США).

Для доказательства присутствия клеток MCF-7 человека в тканях мышей использовали иммуногистохимическое выявление маркерного цитокератина 8/18, клон EP 17+EP30 с помощью наборов Dako Cytomation (Дания). Визуализацию проводили с помощью непрямого иммунопероксидазного метода, использовали позитивные контроли антигенов, негативные контроли антигенов и антител².

В качестве показателей, определяющих противоопухолевые эффекты тестируемых соединений, были выбраны динамика массы тела животных, расчетный объем опухолевой ткани, гистологическая характеристика места инъекции.

Для общего заключения о состоянии опухоли рассчитывали гистологический индекс, основанный на градации РМЖ от 0 (для нормальной неопухолевой ткани) до 10 (для недифференцированной опухоли³) с небольшим отклонением; в связи с относительно малым количеством опухолевой ткани максимальные значения митотического индекса уменьшены до 4 (табл.2).

Статистический анализ

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (Dell, США). После проверки выборок по критерию Шапиро-Уилка на предмет соответствия нормальному распределению и установления его отсутствия результаты представляли как медиана, границы первого и третьего квартилей – Me [Q1÷Q3]. Внутригрупповой сравнительный анализ проводили по критерию Краскела-Уоллиса, сравнение между несвязанными выборками – по критерию Манна-Уитни. Различия считали значимыми при уровне доверительной вероятности $p < 0,05$.

Результаты

Динамика массы тела и объема опухолевой ткани

Введение опухолевых клеток мышам сопровождалось прекращением их роста и потерей массы тела, которое составило во всех экспериментальных группах за период от инъекции MCF-7 до введения противоопухолевого препарата от 6 до 11% от исходной величины (табл. 3).

² Франк Г.А. Рак молочной железы. Практическое руководство для врачей. Под ред. Г.А. Франка, Л.Э. Завалишиной и К.М. Пожарисского. М.: РМАПО, 2014. 197 с.

³ Там же.

Таблица 1 – Характеристика групп экспериментальных животных

Группа	Вещество	Доза	Число голов
Контрольная	Физиологический раствор	–	6
1а	Имидазотетразин 1	1/10 IC ₅₀	6
1б		1/2 IC ₅₀	6
2а	Имидазотриазин 2	1/10 IC ₅₀	6
2б		1/2 IC ₅₀	6
3а	Имидазотриазин 3	1/10 IC ₅₀	6
3б		1/2 IC ₅₀	6
Сравнения	Эпирубицин	1/2 IC ₅₀	6

Таблица 2 – Гистологическая градация рака молочной железы для определения гистологического индекса в экспериментах на иммунодефицитных мышах

Критерии	Оценка в баллах
Структурообразование:	
Железистые/тубулярные структуры занимают:	
– более 75% площади опухоли	1
– от 10 до 75% площади опухоли	2
– менее 10% площади опухоли	3
Ядерный полиморфизм:	
Мономорфные мелкие ядра с четким контуром, равномерным хроматином, сходные с ядрами нормального эпителия	1
Укрупненные умеренно полиморфные везикулярные ядра с заметными ядрышками	2
Полиморфные вариабельные по размеру везикулярные ядра с заметными ядрышками, нередко атипичной формы	3
Митозы и инвазии:	
Единичные митозы	1
Множественные митозы	2
Множественные митозы и инвазия G1	2
Множественные митозы и инвазия G2-G3	4

Таблица 3 – Противоопухолевые эффекты азолазинов 1–3 и эпирубина при ортотопической трансплантации иммунодефицитным мышам клеток МСF-7

Группа (все n=6)	Масса мышей, г		Объем опухоли на 15-е сут, мм ²
	Начальная	Конечная	
Контроль	48,8 [46,9÷50,7]	40,7 [37,9÷43,1]	24,5 [19,9÷27,8]
Эпирубицин 1/2 IC ₅₀	48,3 [46,2÷50,0]	43,1 [40,5÷46,2]*	18,5 [15,6÷20,9]*
Имидазотетразин 1			
	1/10 IC ₅₀	47,5 [46,1÷48,8]*	12,4 [9,9÷15,1]*#
	1/2 IC ₅₀	48,6 [46,5÷50,5]*#	9,6 [7,7÷11,8]*#
Имидазотриазин 2			
	1/10 IC ₅₀	45,1 [43,4÷46,9]*	18,7 [15,1÷20,4]*
	1/2 IC ₅₀	46,3 [44,5÷47,4]*	16,5 [13,3÷19,0]*
Имидазотриазин 3			
	1/10 IC ₅₀	45,6 [43,3÷48,0]*	17,3 [14,8÷20,5]*
	1/2 IC ₅₀	46,9 [43,7÷48,2]*	15,0 [12,9÷18,1]*#

Примечание: статистически значимые различия * – между применением производного азолазина и контролем; # – между применением производного азолазина и применением эпирубина ($p < 0,05$).

Таблица 4 – Гистологический индекс при введении азолазинов 1–3 и эпирубина в модели ортотопической трансплантации мышам клеток РМЖ человека МСF-7

Тестируемое соединение	Доза	
	1/10 IC ₅₀	1/2 IC ₅₀
Контроль	8,8 [7,7÷9,6]	
Эпирубицин	–	8,5 [7,2÷9,4]
Имидазотетразин 1	8,9 [7,7÷9,7]	8,2 [7,3÷9,1]
Имидазотриазин 2	8,5 [7,4÷9,3]	9,1 [7,9÷9,8]
Имидазотриазин 3	8,4 [7,5÷9,2]	8,8 [7,7÷9,6]

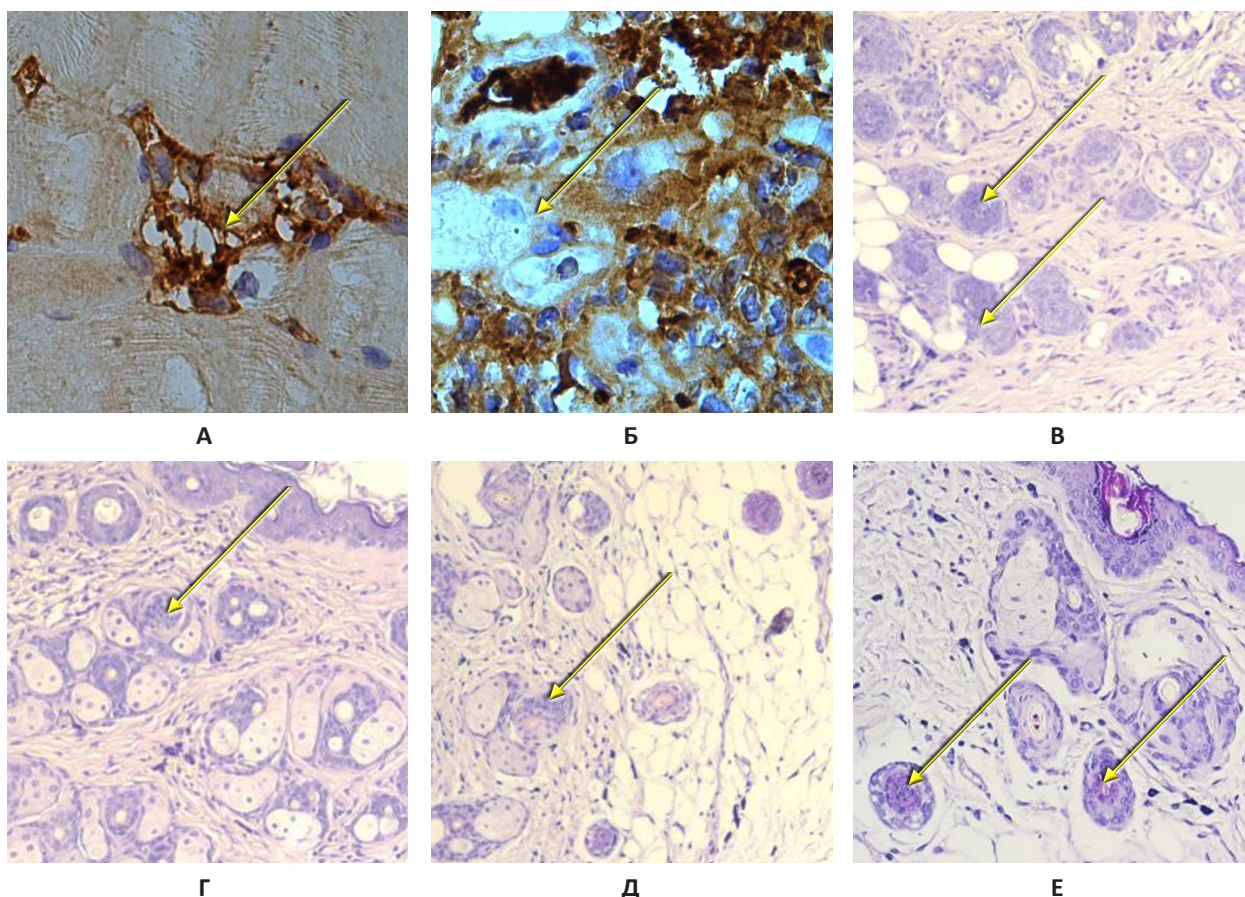


Рисунок 1 – Область трансплантации клеток MCF-7 мышам в ксеногенной модели рака молочной железы человека

Примечание: А – контрольная серия без применения противоопухолевых препаратов. Отмечено скопление иммунопозитивного материала в области сосудисто-нервного пучка прилегающей мышцы; Б – применение имидазотриазина 2. Отмечено скопление опухолевых клеток с инвазией в просвет протока молочной железы; В – применение эпирубина. Отмечены пери- и интрадуктальные скопления опухолевых клеток; Г – применение имидазотетразина 1. Отмечены единичные скопления опухолевых клеток вокруг протоков молочной железы и в прилегающей жировой клетчатке; Д – применение имидазотриазина 2. Отмечено скопление опухолевых клеток с инвазией в просвет протока молочной железы; Е – применение имидазотриазина 3. Гистологическая картина, аналогична применению имидазотриазина 2. А, Б – иммуногистохимическое выявление цитокератина 8/18 человека; В–Е – окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

За этот же период времени масса тела intactных мышей увеличилась в среднем на 2%. Введение тестируемых соединений в определенной степени изменяло динамику массы тела животных, но эти изменения были различны в зависимости от соединения и его дозы.

Введение препарата сравнения эпирубина сопровождалось замедлением снижения массы тела мышей, которая в итоге составляла 89,2% от первоначальной против 83,4% в контроле. Объем опухоли, рассчитанный на 15-е сут эксперимента при аутопсии, составил 75,5% от аналогичного без введения противоопухолевого препарата.

Имидазотетразин 1 вызывал прекращение потери массы тела мышей и ее прирост за 15 суток приводил к восстановлению этого показателя до первоначального (при использовании дозы $1/10 IC_{50}$ – 98,8%, при использовании дозы $1/2 IC_{50}$ – 101,6%). Особенно интенсивным было восстановление массы в первые 3-е сут после инъекции производного: за это время масса увеличилась более чем на 10%. Объем опухоли, рассчитанный на 15-е сут эксперимента

при аутопсии, составил при использовании дозы $1/10 IC_{50}$ – 50,6% от аналогичного в контроле, при использовании дозы $1/2 IC_{50}$ – 39,2% ($p < 0,05$).

При введении подопытным мышам с трансплантированными опухолевыми клетками MCF-7 имидазотриазина 2 прослеживали динамику массы тела, сходную с таковой при введении эпирубина. Стабилизация массы и ее небольшое увеличение к 15-м сут эксперимента приводило к конечной массе при использовании дозы $1/10 IC_{50}$ в 92,0% от первоначальной, при использовании дозы $1/2 IC_{50}$ – 94,5%. Объем опухоли, рассчитанный на 15-е сут эксперимента при аутопсии, составил при использовании дозы $1/10 IC_{50}$ – 76,3% от аналогичного в контроле, при использовании дозы $1/2 IC_{50}$ – 67,3%, что соответствовало торможению роста опухоли на 23, и 32,7% соответственно ($p < 0,05$).

Введение имидазотриазина 3 вызывало прекращение потери массы тела и ее прирост в первые 3-е сут на 11,5%. В последующем динамика массы тела стабилизировалась, и к 15-м сут эксперимента она составила 94,2% от первоначально

при использовании дозы $1/10 IC_{50}$ и 96,9% – при использовании дозы $1/2 IC_{50}$. Объем опухоли, рассчитанный на 15-е сут эксперимента при аутопсии, составил при использовании дозы $1/10 IC_{50}$ 70,6% от аналогичного без введения противоопухолевого препарата и 61,2% – при использовании дозы $1/2 IC_{50}$. Это соответствовало торможению роста опухоли на 29,4 и 38,8% соответственно ($p < 0,05$).

Результаты гистологического исследования

При гистологическом исследовании выявлены изменения в зоне трансплантации, а также прилегающей жировой клетчатке и лимфатических узлах (Рис. 1).

Окраска на цитокератин 8/18 человека выявила присутствие этого белка в тканях мыши, что свидетельствовало о валидности примененной методики. В случаях, когда клетки MCF-7 подвергались лизису, маркерный белок выявлялся в межклеточном веществе, поскольку он достаточно трудно поддается протеолизу (Рис. 1А и 1Б).

Морфологическая картина в месте ксенотрансплантации клеток MCF-7 на 15-е сут эксперимента во всех опытных группах характеризовалась наличием единичных опухолевых клеток, а также их скоплений в виде небольших кластеров или трабекул. Количество стромы между опухолевыми клетками в случае формирования кластеров было минимальным. Вокруг сосудов среднего калибра и протоков молочной железы в ряде случаев наблюдали образование цепочки и структур наподобие мишени или «совиного глаза». В протоках иногда выявляли полную обтурацию просвета инвазивными клетками MCF-7, но чаще такие клетки были единичными, а часть просвета была заполнена слизеподобным секретом. В случае гибели опухолевые клетки теряли ядро и были окружены лимфогистиоцитарным инфильтратом. Небольшое количество клеток лимфоцитарного ряда могло быть обнаружено и вокруг кластеров жизнеспособных опухолевых клеток (рис. 1В–1Е).

Сами опухолевые клетки были крайне вариабельными по строению. Ядра клеток обычно были крупными, полиморфными, с преобладанием округлых форм. Они располагались, как правило, центрально и содержали хорошо различимые ядрышки. Цитоплазма клеток была преимущественно обширной и выражено эозинофильной. Митотическая активность на препаратах варьировала от единичных митозов до 10–15 делений в поле зрения.

Помимо местной инвазии в просвет протоков, лимфатических и (заметно реже) кровеносных сосудов, опухолевые клетки смогли распространиться в прилегающие ткани и лимфатические узлы. В фиброзно-жировой ткани, окружающей молочную железу, обнаруживались как единичные клетки MCF-7, так скопления по 7–12 клеток, часто с умеренной лимфогистиоцитарной инфильтрацией вокруг них. В жировой ткани опухолевые скопления были крупнее, морфологически они выглядели как типичные микрометастазы, тесно прилегающие к

питающим сосудам. В лимфатических узлах клетки MCF-7 обычно располагались единично, вокруг них присутствовала ярко выраженная тканевая реакция со стороны макрофагов и лимфоидной ткани.

Определение гистологического индекса позволило дать полуколичественную оценку гистологическим изменениям в зоне ксенотрансплантации клеток РМЖ человека при тестировании производных азолоазинов и препарата сравнения (табл. 4).

Как видно из представленных данных, применение эпирубина в дозе $1/2 IC_{50}$ практически не изменяло гистологический индекс опухолей, в сравнении с величиной показателя в контрольной группе животных.

Значения гистологического индекса во всех группах практически не отличались от контроля (максимальное снижение при введении имидазотетразина 1 – на 9,3%), что еще раз подтверждало тот факт, что клетки, нечувствительные к примененной химиотерапии, сохраняют высокую способность к злокачественной прогрессии в организме и даже могут ее увеличивать.

ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие виртуального скрининга, химических технологий целенаправленного синтеза органических соединений с предсказанными свойствами, а также медицинской биотехнологии испытаний потенциальных лекарственных средств в культурах *in vitro* и модифицированных моделях на лабораторных животных стали основой для новой эры разработки и внедрения современных химиотерапевтических средств. Современная парадигма подразумевает, что химическая структура этих соединений с момента предъявления исследователями доказательно предполагает противоопухолевую активность (докинг или ближайшие аналоги имеющихся препаратов). По результатам доклинических испытаний препараты имеют четко обозначенные мишени воздействия, доказанную высокую противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo*, обладают минимальными токсическими эффектами в отношении здоровых тканей и не вызывают быстрого развития резистентности [24–26].

Применительно к тематике настоящего исследования следует подчеркнуть, что решение проблемы РМЖ в вопросах профилактики, ранней диагностики, лечения и реабилитации отнесено к приоритетным задачам мирового и отечественного здравоохранения [1, 5].

Выбранный нами класс соединений (производных имидазотриазина и имидазотетразина) в этом плане привлекателен как ввиду достаточного количества хорошо зарекомендовавших себя представителей, включая митозоламид и темозоломид, а также появления протоколов синтеза новых соединений с потенциально перспективными свойствами [12, 19]. По результатам доказательных исследований, соединения этого класса проявляют противоопухолевую, противовоспалительную, антиоксидантную, а также антибактериальную активность [27, 28].

Ортотопическая имплантация раковых клеток в ткани молочной железы животных позволяет весьма точно воспроизводить опухолевое микроокружение и во многом напоминает множественные стадии, участвующие в развитии РМЖ у пациентов [23, 29].

Проведенное исследование показало, что в ксеногенной модели РМЖ, полученной ортотопической инъекцией клеток линии MCF-7 мышам, все включенные в работу производные азолазинов проявляли противоопухолевую активность, которая имеет признаки дозозависимости и убывает в ряду имидазотетразин **1** (лидер) > имидазотриазин **3** > имидазотриазин **2** ≥ эпирубицин. Максимальное торможение роста опухоли при введении наиболее активного производного темозоломида **1** составляло 60,8%, что значительно превышало активность препарата сравнения эпирубина (24,5%). Препарат в значительной степени подавлял пролиферацию и распространение опухолевых клеток в модели ксенотрансплантации клеток линии MCF-7 РМЖ человека мышам. Введение препарата сопровождалось снижением гистологического индекса злокачественности для сохранившихся клеток на 9,3%.

Гистологическая картина во всех сериях экспериментов свидетельствовала об уменьшении и распаде части опухолевых структур в тканях мышей, но сохранившиеся клетки демонстрировали выраженный атипизм, склонность к митозам и инвазии, образовывали свежие скопления в ткани молочной железы, прилегающей жировой клетчатке и лимфатических узлах.

Как видно, все три препарата, выбранные по проведенным ранее исследованиям цитотоксичности на клетках РМЖ человека и неопухолевых клетках *in vitro*, показали результаты, превышающие таковые для препарата сравнения эпирубина. Фармакодинамические свойства эпирубина хорошо изучены и аналогичны свойствам других антрациклиновых противоопухолевых антибиотиков. Эпирубин наиболее активен в фазах клеточного цикла, сопровождающихся максимально интенсивным синтезом ДНК. После интеркаляции между парами оснований ДНК он стабилизирует комплекс топоизомеразы II-ДНК, что приводит к необратимому разрыву нити. Для эпирубина доказана цитотоксичность как *in vitro*, так и *in vivo* в отношении РМЖ и ряда других опухолевых клеток человека, и гибель клеток возрастает по мере увеличения концентрации препарата [30]. Тем не менее, активность препарата достаточно умеренная, что и продемонстрировало настоящее исследование. Следовательно, эпирубин может считаться классическим препаратом сравнения для новых доклинических испытаний, которые призваны найти новые, более эффективные препараты для химиотерапии опухолей.

Сравнение противоопухолевой активности в модели *in vivo* трех производных азолазинов показало, что, несмотря на сходную структуру и физико-химические свойства, эти соединения

проявляют неодинаковую активность по отношению к клеткам РМЖ. Известными причинами, которые вызывают различия в противоопухолевых эффектах гомологичных молекул, являются, в первую очередь, различия в характере распределения в организме при парентеральном введении и способности к проникновению в клетки-мишени. Полученные нами экспериментальные значения выживаемости опухолевых клеток согласуются с более ранними результатами изучения других производных азолазинов [12, 31, 32].

Имплантация мышам клеточных линий, полученных из рака РМЖ человека, относительно проста и позволяет проводить доказательные генетические или фармакологические манипуляции с имплантированными клетками. Однако в настоящее время справедливо считается, что ксенотрансплантаты опухолей у иммунодефицитных мышей не могут в полной мере моделировать опухоли у человека, в том числе в связи со значительным генетическим полиморфизмом и тем, что человеческие клетки, по-видимому, не полностью адаптированы к росту в тканях мышей [33]. Не случайно в последнее время внимание исследователей все больше сконцентрировано на создании трехмерных моделей раковых опухолей *in vitro*. Моделирование 3D-микросреды, максимально имитирующей микроокружение клеток при РМЖ у человека, делает их ценным инструментом в качестве альтернативы для замены моделей опухолей на животных и для прогнозирования оценки риска у людей [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На ксеногенной модели РМЖ железы человека (культура клеток MCF-7), все три новых производных азолазинов, включенных в исследование, показали противоопухолевую активность, превышающую активность препарата сравнения эпирубина. Среди тестируемых новых производных азолазинов, 3-циклогексил-4-оксоимидазо[5,1-d][1,2,3,5]тетразин-8-N-пиперидинилкарбоксамид является безусловным лидером, вызывающим торможение роста опухоли в ксеногенной модели *in vivo*.

Высокая чувствительность клеточной линии MCF-7 к тестируемым веществам позволяет сделать заключение о перспективности проведения дальнейших доклинических испытаний их эффективности и безопасности. Согласно результатам проведенного исследования новых производных азолазинов можно ожидать торможения роста перевиваемых опухолей у экспериментальных животных в отношении более широкого спектра моделируемых опухолей.

Полученное заключение следует трактовать как предварительное, так как в работе для оценки противоопухолевой активности использован только один подход (ксеногенная трансплантация у мышей) и одна клеточная линия РМЖ – MCF-7. Конкретные механизмы действия производных азолазинов, а также сопоставление их активности со структурными особенностями молекул требуют отдельного дальнейшего изучения.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.Х. Хумаири – разработка основной концепции, гипотезы и дизайна исследования, проведение исследования, обработка данных исследования, написание и редактирование текста; Д.Л. Сперанский – разработка концепции и дизайна исследования; В.В. Новочадов – разработка концепции и дизайна исследования, статистический анализ; С.В. Поройский – проведение исследования, реализация экспериментальной части исследования, обработка данных исследования, редактирование текста; Н.В. Чердынцева – разработка концепции исследования; В.В. Удут – разработка концепции исследования. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Gradishar W.J., Anderson B.O., Abraham J., Aft R., Agnese D., Allison K.H., Blair S.L., Burstein H.J., Dang C., Elias A.D., Giordano S.H., Goetz M.P., Goldstein L.J., Isakoff S.J., Krishnamurthy J., Lyons J., Marcom P.K., Matro J., Mayer I.A., Moran M.S., Mortimer J., O'Regan R.M., Patel S.A., Pierce L.J., Rugo H.S., Sitapati A., Smith K.L., Smith M.L., Soliman H., Stringer-Reasor E.M., Telli M.L., Ward J.H., Young J.S., Burns J.L., Kumar R. Breast Cancer, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology // J Natl Compr Canc Netw. – 2020. – Vol. 18, No. 4. – P. 452–478. DOI: 10.6004/jnccn.2020.0016
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA Cancer J Clin. – 2021. – Vol. 71. P. – 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660
3. Wilkinson L., Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern // Br J Radiol. – 2022. – Vol. 95. – Art. ID: 20211033. DOI: 10.1259/bjr.20211033
4. Akram M., Iqbal M., Daniyal M., Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer // Biol Res. – 2017. – Vol. 50. – Art. ID: 33. DOI: 10.1186/s40659-017-0140-9
5. Rositch A.F., Unger-Saldaña K., DeBoer R.J., Ng'ang'a A., Weiner B.J. The role of dissemination and implementation science in global breast cancer control programs: Frameworks, methods, and examples // Cancer. – 2020. – Vol. 126. – P. 2394–2404. DOI: 10.1002/cncr.32877
6. Longacre M., Snyder N.A., Housman G., Leary M., Lapinska K., Heerboth S., Willbanks A., Sarkar S. A comparative analysis of genetic and epigenetic events of breast and ovarian cancer related to tumorigenesis // Int J Mol Sci. – 2016. – Vol. 17, No. 5. – Art. ID: 759. DOI: 10.3390/ijms17050759
7. Feiten S., Dünnebacke J., Friesenhahn V., Heymanns J., Köppler H., Meister R., Thomalla J., van Roye C., Wey D., Weide R. Follow-up reality for breast cancer patients – standardised survey of patients and physicians and analysis of treatment data // Geburtshilfe Frauenheilkd. – 2016. – Vol. 76, No. 5. – P. 557–563. DOI: 10.1055/s-0042-106210
8. Asif H.M., Sultana S., Ahmed S., Akhtar N., Tariq M. HER-2 Positive breast cancer – a mini-review // Asian Pac J Cancer Prev. – 2016. – Vol. 17, No. 4. – P. 1609–1615. DOI: 10.7314/apjcp.2016.17.4.1609
9. Azamjah N., Soltan-Zadeh Y., Zayeri F. Global trend of breast cancer mortality rate: a 25-year study // Asian Pac J Cancer Prev. – 2019. – Vol. 20. – P. 2015–2020. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.7.2015
10. Hassan M.S., Ansari J., Spooner D, Hussain S.A. Chemotherapy for breast cancer (Review) // Oncol Rep. – 2010. – Vol. 24. – P. 1121–1131. DOI: 10.3892/or_00000963
11. Zhukova L.G., Andreeva I.I., Zavalishina L.E., Zakiriakhodzhaev A.D., Koroleva I.A., Nazarenko A.V., Paltuev R., Parokonnaia A., Petrovskii A., Portnoi S., Semiglazov V., Semiglazova T., Stenina M., Stepanova A., Trofimova O., Tyulyandin S., Frank G., Frolova M., Shatova I., Gevorkian T. Breast cancer // J Modern Oncol. – 2021. – Vol. 23. – P. 5–40. DOI: 10.26442/18151434.2021.1.200823
12. Shirazi F., Zarghi A., Kobarfard F., Zendehele R., Nakhjavani M., Arfaiee S., Zebardast T., Mohebi S., Anjidani N., Ashtarinezhad A., Shoeibi S. Remarks in successful cellular investigations for fighting breast cancer using novel synthetic compounds. In: Breast Cancer-Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis. InTech, 2011. DOI: 10.5772/23005
13. Garza-Morales R., Gonzalez-Ramos R., Chiba A., Montes de Oca-Luna R., McNally L.R., McMasters K.M., Gomez-Gutierrez J.G. Temozolomide enhances triple-negative breast cancer virotherapy in vitro // Cancers (Basel). – 2018. – Vol. 10. – Art. ID: 144. DOI: 10.3390/cancers10050144
14. Stevens M.F.G. Temozolomide – birth of a blockbuster. Drug Discovery. 2009. – No. 7. – P. 48–51.
15. Harbeck N., Gnant M. Breast cancer // Lancet. – 2017. – Vol. 389, No. 10074. – P. 1134–1150. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8
16. Moody C.L., Wheelhouse R.T. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs // Pharmaceuticals (Basel). – 2014. – Vol. 7, No. 7. – P. 797–838. DOI: 10.3390/ph7070797
17. Мндлян Е.Ю., Семушина С.Г., Ржевский Д.И., Новикова Н.И., Калабина Е.А., Комков Д.С., Масленикова А.Ю., Мурашев А.Н., Холмухамедов Э.Л. Создание ортотопических опухолей в молочной железе мышей BALB/C NUDE клетками рака молочной железы человека MCF-7 и ее VDAC-дефицитными производными // Сибирский онкологический журнал. – 2022. – Т. 21, № 1. – С. 72–84. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-72-84
18. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16, № 3. – С. 6–13. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13

19. Sadchikova E.V., Mokrushin V.S. Interaction of 3,8-disubstituted imidazo-[5,1-C][1,2,4]triazines with nucleophiles // *Chem Heterocycl Comp*. 2014. – Vol. 50. – P. 1014–1020. DOI: 10.1007/s10593-014-1557-5
20. Sadchikova E.V. Synthesis of new azolo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-4-ones – analogs of antitumor agent temozolomide // *Russ Chem Bull*. – 2016. – Vol. 65. – P. 1867–1872. DOI: 10.1007/s11172-016-1522-9
21. Liu L, Mu LM, Yan Y, Wu JS, Hu YJ, Bu YZ, Zhang JY, Liu R, Li XQ, Lu WL. The use of functional epirubicin liposomes to induce programmed death in refractory breast cancer. *Int J Nanomedicine*. 2017. – Vol. 12. P. 4163–4176. DOI: 10.2147/IJN.S133194
22. Хумаири А.Х., Сперанский Д.Л., Садчикова Е.В. Синтез и цитотоксическая активность новых производных азолотриазина при изучении на клеточных культурах // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2022. – Т. 56, № 6. – С. 17–22. DOI: 10.1007/s11094-022-02704-0
23. Iorns E., Drews-Elger K., Ward T.M., Dean S., Clarke J., Berry D., El Ashry D., Lippman M. A new mouse model for the study of human breast cancer metastasis // *PLoS ONE*. 2012. – Vol. 7, No. 10. – Art. ID: 47995. DOI: 10.1371/journal.pone.0047995
24. Dai X., Cheng H., Bai Z., Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping // *J Cancer*. – 2017. – Vol. 8, No. 16. – P. 3131–3141. DOI: 10.7150/jca.18457.
25. Clegg J., Koch M.K., Thompson E.W., Haupt L.M., Kalitade Croft P., Bray L.J. Three-dimensional models as a new frontier for studying the role of proteoglycans in the normal and malignant breast microenvironment // *Front Cell Dev Biol*. – 2020. – Vol. 8. – Art. ID: 569454. DOI: 10.3389/fcell.2020.569454
26. Yan S., Yue S. Identification of early diagnostic biomarkers for breast cancer through bioinformatics analysis // *Medicine (Baltimore)*. – 2023. – Vol. 102, No. 37. – Art. ID: e35273. DOI: 10.1097/MD.00000000000035273
27. Ahani Z., Nikbin M., Maghsoudlou M.F., Farhadi-Ghalati F., Valizadeh J., Beyzaei H., Moghaddam-Manesh M. Semi-synthesis, antibacterial and antifungal activities of three novel thiazolidin-4-one by essential oil of *Anethum graveolens* seeds as starting material // *JIRAN Chem Soc*. –2018. – Vol. 15. – P. 2423–2430. DOI: 10.1007/s13738-018-1431-y
28. Horishny V., Mandzyuk L., Lytvyn R., Bodnarchuk O.V., Matychuk V.S., Obushak M.D. Synthesis and biological activity of pyrazolo[1,5-c][1,3]benzoxazines containing a thiazolidin-4-one fragment // *Russ J Org Chem*. – 2020. – Vol. 56, No. 4. – P. 588–595. DOI: 10.1134/S1070428020040053
29. Sousa C.R.S., Miranda-Vilela A.L., de Almeida M.C., Fernandes J.M.S., Sebben A., Chaves S.B., Magalhães K.G., da Silva C.R., de Paula Rôlo J.L.J., Lucci C.M., Lacava Z.G.M. Experimental orthotopic breast cancer as a model for investigation of mechanisms in malignancy and metastasis to the lymph nodes // *Int J Vet Sci Res*. – 2019. – Vol. 5, No. 2. – P. 46–57. DOI: 10.17352/ijvsr.000041
30. Khodadadi A., Faghih-Mirzaei E., Karimi-Maleh H., Abbaspourrad A., Agarwal S., Gupta V.K. A new epirubicin biosensor based on amplifying DNA interactions with polypyrrole and nitrogen-doped reduced graphene: experimental and docking theoretical investigations // *Sensors and Actuators B: Chem*. – 2019. – Vol. 284. – P. 568–574. DOI: 10.1016/j.snb.2018.12.164
31. Sztanke K., Pasternak K., Rzymowska J., Sztanke M., Kandefer-Szerszeń M. Synthesis, structure elucidation and identification of antitumoural properties of novel fused 1,2,4-triazine aryl derivatives // *Eur J Med Chem*. – 2008. – Vol. 43, No. 5. – P. 1085–1094. DOI: 10.1016/j.ejmech.2007.07.009
32. Wang X., Luo N., Xu Zh., Zheng X., Huang B., Pan X. The estrogenic proliferative effects of two alkylphenols and a preliminary mechanism exploration in MCF-7 breast cancer cells // *Environ Toxicol*. – 2020. – Vol. 35, No. 5. – P. 628–638. DOI: 10.1002/tox.22898
33. Carranza-Torres I.E., Guzmán-Delgado N.E., Coronado-Martínez C., Bañuelos-García J.I., Viveros-Valdez E., Morán-Martínez J., Carranza-Rosales P. Organotypic culture of breast tumor explants as a multicellular system for the screening of natural compounds with antineoplastic potential // *Biomed Res Int*. – 2015. – Vol. 2015. – Art. ID: 618021. DOI: 10.1155/2015/618021
34. Carranza-Rosales P., Guzmán-Delgado N.E., Carranza-Torres I.E., Viveros-Valdez E., Morán-Martínez J. Breast organotypic cancer models // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 2018. – Vol. 86. – P. 1–25. DOI: 10.1007/82_2018_86

АВТОРЫ

Хумаири Ахмед Хамид – PhD Фармакология, клиническая фармакология и Онкология, лучевая терапия, преподаватель кафедры медицины катастроф Института общественного здоровья ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; постдок лаборатории физиологии, молекулярной и клинической фармакологии, НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ ТНИМЦ РАН. ORCID ID: 0000-0001-7545-8567. E-mail: ahmed.h.mneahil@gmail.com

Сперанский Дмитрий Леонидович – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры онкологии, гематологии и трансплантологии Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-4362-1603. E-mail: d_speransky@mail.ru

Новоцадов Валерий Валерьевич – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биологии и биотехнологии Института естественных

наук, ФГАОУ ВО ВолГУ. ORCID ID: 0000-0001-6317-7418. E-mail: novochadov.valeriy@volsu.ru

Поройский Сергей Викторович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой медицины катастроф Института общественного здоровья, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID: 0000-0001-6990-6482. E-mail: poroyskiy@mail.ru

Чердынцева Надежда Викторовна – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе НИИ онкологии ФГБНУ ТНИМЦ РАН; член-корреспондент РАН. ORCID ID: 0000-0003-1526-9013. E-mail: nvch@tnimc.ru

Удут Владимир Васильевич – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе, заведующий лабораторией физиологии, молекулярной и клинической фармакологии, НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ ТНИМЦ РАН; член-корреспондент РАН. ORCID ID: 0000-0002-3829-7132. E-mail: udutv@mail.ru

УДК 615.322:547.9+543.544



Фитохимическое и фармакологическое исследование биологически активных веществ и сухих экстрактов почек тополя краснонервного (*Populus rubrinervis* Hort. Alb.) различной полярности

Е.А. Урбанчик, В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, В.М. Рыжов, А.В. Дубищев,
А.С. Цибина, А.И. Алтарева, Ю.Д. Сироткина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Получена 18.07.2023

После рецензирования 25.10.2023

Принята к печати 30.10.2023

Цель. Проведение фитохимического и фармакологического исследования биологически активных веществ (БАВ) и препаратов на основе почек тополя краснонервного (*Populus rubrinervis* Hort. Alb.) различной полярности.

Материалы и методы. Объектом исследования стали сухие экстракты почек тополя краснонервного, образцы которых были заготовлены в январе–марте 2023 года на территории Ботанического сада Самарского университета (г. Самара, Россия). Разделение суммы действующих веществ проводили последовательно методом циркуляционной экстракции (хлороформ), а затем методом дробной перколяции получали настойку на спирте этиловом 70% (1:5). В качестве стандартного образца (СО) использовали пиностробин. Анализ веществ проводили методом тонкослойной хроматографии. Регистрацию УФ-спектров осуществляли с помощью спектрофотометра «Specord®40» (Analytik Jena, Германия). Исследование фармакологической (диуретической) активности сухих экстрактов почек тополя краснонервного проводили на 60 белых аутбредных крысах обоего пола массой 200–220 г в экспериментах с водным диурезом.

Результаты. Получены сухие экстракты на основе почек тополя краснонервного различной полярности (экстракт № 1 (хлороформ) и экстракт № 2 (спирт этиловый 70%). Методом тонкослойной хроматографии определено, что доминирующие комплексы липофильной природы с пиностробином изолированы в экстракт № 1, в экстракте № 2 преобладают фенольные вещества гликозидной природы. Несмотря на разную полярность экстрагентов, спектральные характеристики экстракта № 2 имели значительное сходство с экстрактом № 1. При изучении диуретической активности определено, что при введении СО пиностробина в дозе 1 мг/кг за 4 ч опыта было отмечено изолированное повышение диуреза (с $1,72 \pm 0,11$ до $1,97 \pm 0,03$ мл, $p < 0,05$), в то же время за 24 ч опыта отмечено изолированное повышение креатининурина (с $1,50 \pm 0,29$ до $2,39 \pm 0,15$ мг, $p < 0,05$). При введении экстракта № 2 в дозе 10 мг/кг отмечено умеренное достоверное повышение диуреза (с $1,82 \pm 0,02$ до $2,07 \pm 0,04$ мл и с $2,38 \pm 0,39$ до $3,02 \pm 0,11$ мл, $p < 0,05$) и значительное увеличение креатининурина (с $0,14 \pm 0,01$ до $0,19 \pm 0,03$ мг и с $2,31 \pm 0,42$ до $2,79 \pm 0,51$ мг, $p < 0,05$) за 4 и 24 ч опыта соответственно.

Заключение. Проведено экстракционное разделение суммы веществ почек тополя краснонервного по степени полярности. СО пиностробина в дозе 1 мг/кг и экстракт № 2 в дозе 10 мг/кг проявляли диуретическую активность, в связи с чем и являются перспективными в плане разработки эффективных лекарственных средств.

Ключевые слова: тополь краснонервный; *Populus rubrinervis* Hort. Alb.; почки; сухой экстракт; пиностробин; УФ-спектрофотометрия; диуретическая активность

Список сокращений: ЛРП – лекарственный растительный препарат; ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации; БАВ – биологически активные вещества; СО – стандартный образец; ДСК – диазобензолсульфоуксусная кислота; ФС – фармакопейная статья.

Для цитирования: Е.А. Урбанчик, В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, В.М. Рыжов, А.В. Дубищев, А.С. Цибина, А.И. Алтарева, Ю.Д. Сироткина. Фитохимическое и фармакологическое исследование биологически активных веществ и сухих экстрактов почек тополя краснонервного (*Populus rubrinervis* Hort. Alb.) различной полярности. *Фармация и фармакология*. 2023;11(4):301-311. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-301-311

© Е.А. Урбанчик, В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, В.М. Рыжов, А.В. Дубищев, А.С. Цибина, А.И. Алтарева, Ю.Д. Сироткина, 2023

For citation: E.A. Urbanchik, V.A. Kurkin, E.N. Zaitceva, V.M. Ryzhov, A.V. Dubishchev, A.S. Tsibina, A.I. Altareva, Yu.D. Sirotkina. Phytochemical and pharmacological study of biologically active compounds and dry extracts of *Populus rubrinervis* Hort. Alb. buds of various polarities. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(4):301-311. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-301-311

Phytochemical and pharmacological study of biologically active compounds and dry extracts of *Populus rubrinervis* Hort. Alb. buds of various polarities

E.A. Urbanchik, V.A. Kurkin, E.N. Zaitceva, V.M. Ryzhov, A.V. Dubishchev,
A.S. Tsibina, A.I. Altareva, Yu.D. Sirotkina

Samara State Medical University,
89, Chapaevskaya Str., Samara, Russia, 443099

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Received 18 July 2023

After peer review 25 Oct 2023

Accepted 30 Oct 2023

The aim of the work was a phytochemical and pharmacological study of biologically active compounds (BACs) and *Populus rubrinervis* Hort. Alb. buds preparations of various polarities.

Materials and methods. The object of the study was dry extracts of *P. rubrinervis* Hort. Alb. buds the samples of which were prepared in January–March 2023 in the Botanical Garden of Samara University (Samara, Russia). The separation of the amount of current substances was carried consecutively by the method of circulating extraction (chloroform), then, by the method of fractional percolation, a tincture was received on 70% ethyl alcohol (1:5). Pinostrobin was used as the standard sample (SS). The analysis of the substances was carried out by the TLC method. The electronic spectra registration was carried out with a spectrophotometer “Specord 40” (Analytik Jena, Germany). The study of the pharmacological (diuretic) activity of *P. rubrinervis* Hort. Alb. buds dried extracts was carried out on 60 white outbred rats of both sexes weighing 200–220 g in the experiments with aqueous diuresis.

Results. *P. rubrinervis* Hort. Alb. buds dried extracts of various polarities (extract No. 1 (chloroform) and extract No. 2 (70% ethanol) were received. By the method of thin-layer chromatography, it was determined that the dominant complexes of the lipophilic nature with pinostrobin are isolated in extract No. 1, phenolic substances of the glycoside nature prevail in extract No. 2. Despite various polarities of the extragents, spectral characteristics of extract No. 2 have significant similarities with extract No. 1. When studying the diuretic activity, it was established that when SS pinostrobin was injected at a dose of 1 mg/kg, for 4 h of the experiment, an isolated increase in diuresis was noted (from 1.72 ± 0.11 to 1.97 ± 0.03 ml, $p < 0.05$); at the same time, an isolated increase in creatininuresis (from 1.50 ± 0.29 to 2.39 ± 0.15 mg, $p < 0.05$) was observed during 24 h of the experiment. When extract No. 2 was injected at a dose of 10 mg/kg, there was a moderate significant increase in diuresis (from 1.82 ± 0.02 to 2.07 ± 0.04 ml and from 2.38 ± 0.39 to 3.02 ± 0.11 ml, $p < 0.05$) and a significant increase in creatininuresis (from 0.14 ± 0.01 to 0.19 ± 0.03 mg and from 2.31 ± 0.42 to 2.79 ± 0.51 mg, $p < 0.05$) for 4 and 24 h of the experiment, respectively.

Conclusion. The extraction separation of the amount of *P. rubrinervis* Hort. Alb. buds by the polarity degree was carried out. Pinostrobin SS at a dose of 1 mg/kg and extract No. 2 at a dose of 10 mg/kg had a diuretic activity, in connection with which they are promising in terms of the development of effective drugs.

Keywords: *Populus rubrinervis* Hort. Alb.; dry extract; pinostrobin; UV spectrophotometry; diuretic activity

Abbreviations: HM – herbal medicine; SPh RF – State Pharmacopoeia of the Russian Federation; BAC – biologically active compounds; SS – standard sample; DSA – diazobenzenesulfonic acid; PhM – pharmacopoeial monograph.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время лекарственные растительные препараты (ЛРП) активно используются в медицинской практике для лечения и профилактики различных заболеваний [1–4]. Такие ЛРП обладают рядом преимуществ перед синтетическими: относительно безопасны, менее токсичны, имеют более широкий спектр действия [4, 5].

Одним из интересных и перспективных источников ЛРП являются растения семейства ивовых (*Salicaceae*) рода Тополь (*Populus* L.), широко произрастающие в странах умеренного пояса: Западной и Восточной Сибири, Европе, Восточном Казахстане, Центральной Азии, Западном Китае [5–8]. В средней полосе России произрастает около 20 видов тополя, из них наиболее распространенные, в т.ч. в Самарской области: т. черный; т. канадский; т. душистый; т. лавролистный; т. бальзамический;

т. белый; т. дрожащий (осина); т. красонервный [6, 9, 10]. Современная Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV изд.) включает ФС.2.5.0042.15 «Тополя почки»¹, фармакопейными являются следующие виды: т. черный (*Populus nigra* L.), т. бальзамический (*Populus balsamifera* L.), т. канадский (*Populus deltoides* Marsh.), т. душистый (*Populus suaveolens* Fisch.), т. лавролистный (*Populus laurifolia* Ledeb.).

Препараты на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС) данного рода обладают противовоспалительной, жаропонижающей, обезболивающей, ранозаживляющей, противомикробной, противоязвенной активностью и широко используются в официальной и народной

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т. 4. Москва, 2018. – 1832 с. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/topolya-pochki-populi-gemmae/>

медицине [7, 11–13]. В современных научных исследованиях также встречается упоминание об исследовании дигидрохалконов почек *Populus balsamifera* L. в качестве эффективного средства для местного лечения псориаза наряду с противовоспалительным и антиоксидантным действием [14–17].

Химический состав фармакопейного сырья – почек тополя – богат и достаточно разнообразен. В литературных источниках описано, что почки *Populus* L. содержат в основном соединения фенольной природы: простые фенолы (салицин, салициловый спирт); фенольные кислоты, фенилпропаноиды; терпеноиды (моно- и сесквитерпеноиды); флаваноны (пиноцембрин, пиностробин); флавоны (апигенин, хризин, тектохризин); флавонолы (галангин, кемпферол, кверцетин); халконы и дигидрохалконы; кофейные и феруловые кислоты, а также их производные [6, 14, 15, 18]. Следует отметить, что значительный вклад в проявление фармакологической активности ЛРП на основе сырья тополя вносят фенольные соединения: флавоноиды, фенилпропаноиды и простые фенолы [6, 19–21]. Так, ведущей группой БАВ почек фармакопейных видов тополя являются флавоноиды, среди которых доминируют флаваноны – пиностробин (5-гидрокси-7-метоксифлаванон) и пиноцембрин (5,7-дигидроксифлаванон) (Рис. 1), которые обуславливают антимикробную активность препаратов [22–25].

Однако данная группа обладает и другими фармакологическими свойствами [19, 26–28]. Так, в недавнем описанном исследовании проводили сравнение противовоспалительной активности экстрактов почек *Populus* L. и флаванонов (пиноцембрина и пиностробина) в отношении провоспалительных фибробластов десен человека (HGF-1), в котором была раскрыта потенциальная защитная роль как БАВ, так и экстрактов почек тополя и продемонстрированы антиоксидантные свойства [29]. Также оценивали, наряду с антиоксидантной и противовоспалительной, гепатопротекторную и сердечно-сосудистую активность спиртового экстракта почек *Populus nigra* L. В данном исследовании спиртовой экстракт показал значительную противовоспалительную, гепатопротекторную и сосудорасширяющую активность, причем последняя не зависела от эндотелия и, как полагают ученые, была опосредована главным образом способностью отдельных компонентов проявлять антиоксидантные свойства, вероятно, связанные с ингибированием притока ионов Ca^{2+} [30].

Анализ источников литературы показал наличие диуретической активности, а именно увеличение почечной экскреции воды, электролитов, креатинина препаратов и индивидуальных БАВ из сырья растений рода Тополь: отвара коры осины (*Populus tremula* L.) (100 мкл/кг), настоя почек осины (100 мкл/кг), настойки почек осины (100 мкл/кг),

настойки коры осины (100 мкл/кг), настойки почек тополя (50 и 100 мкл/кг) [5]. Тремулоидин, выделенный из коры осины, в дозировках 25 и 50 мг/кг стимулировал диурез, салурез, креатининуризм, а в дозе 100 мг/кг – только выведение натрия, калия и креатинина [5]. Также диуретический эффект обнаружен для сухого экстракта почек т. китайского (*Populus simonii* Carriere) [31, 32].

Таким образом, научные исследования представителей семейства *Salicaceae* рода *Populus* являются в настоящее время актуальными для ученых всего мира. Ежегодно обновляются и обобщаются данные о химическом составе почек растений рода Тополь, а также о фармакологической активности действующих веществ и разработанных лекарственных форм на основе почек растений рода Тополь [19, 22–24].

В настоящее время известно, что т. красонервный (*Populus rubrinervis* Hort. Alb.) активно используется для озеленения населенных пунктов [10]. Он имеет свои отличия и преимущества перед другими видами: все растения являются мужскими экземплярами, не образуют пушистых семян, зимостоек, газоустойчив, хорошо размножается одревесневевшими стеблевыми черенками, отличается наибольшей энергией роста от остальных видов [9, 10, 33]. Значительная фитомасса почки позволяет говорить о большей экономической эффективности в переработке данного сырья относительно классического вида – тополя черного [33]. Однако в литературе информации о химическом составе и фармакологической активности препаратов и БАВ почек т. красонервного крайне мало, что и способствовало нашему научному интересу к данному объекту.

ЦЕЛЬ. Проведение фитохимического и фармакологического исследования биологически активных веществ (БАВ) и препаратов на основе почек тополя красонервного (*Populus rubrinervis* Hort. Alb.) различной полярности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были сухие экстракты почек т. красонервного (*Populus rubrinervis* Hort. Alb.), образцы которых были заготовлены в период с конца января по март 2023 года до набухания. Основной базой сбора сырья были коллекционные посадки Ботанического сада Самарского университета (Самара, Россия). Сушку осуществляли естественным путём без дополнительного обогрева. Высушенное сырьё подвергали классической пробоподготовке в соответствии с требованиями ГФ РФ XV изд. статьи «Почки» (ОФС.1.5.1.0009)². Также нами был проанализирован СО пиностробина (5-гидрокси-7-метокси-2-фенилхроман-4-он), полученный ранее

² Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. Москва, 2023. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-5/1-5-2/pochki/>

из почек т. бальзамического и соответствующий требованиям ФС 42-0073-01 «Пиностробин – стандартный образец».

Приготовление рабочих растворов для анализа методами тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии

В целях разделения суммы действующих веществ, содержащихся в почках т. краснонервного, нами была проведена форэкстракция сырья методом циркуляционной экстракции в аппарате Сокслета. В ходе экстракции насчитано 30 полных циклов, конец экстрагирования определяли по отсутствию окрашивания экстрагента в рабочей колбе прибора. В качестве экстрагента использовали хлороформ. Полученный липофильный хлороформный экстракт почек т. краснонервного (экстракт № 1) упаривали в ротормном испарителе под вакуумом при температуре 45°C до получения сухого экстракта. После форэкстракции обезжиренное сырьё высушивали под тягой без нагрева. Далее на основе данного сырья методом дробной перколяции получали настойку на спирте этиловом 70% в соотношении «сырьё – экстрагент» 1:5. Настойку, аналогично липофильному экстракту, упаривали в ротормном испарителе под вакуумом при температуре 65°C до получения сухого экстракта почек т. краснонервного (экстракт № 2).

Пробоподготовка для сухого экстракта почек т. краснонервного (экстракт № 1)

Около 0,3 г (точная навеска) сухого экстракта почек т. краснонервного (хлороформ) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл спирта этилового 96% при нагревании на кипящей водяной бане и доводили объём раствора до метки тем же растворителем (испытываемый раствор А₁). 1 мл испытываемого раствора А₁ помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 2 мл 3% спиртового раствора алюминия (III) хлорида и доводили объём раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытываемый раствор В₁). В качестве раствора сравнения использовали раствор, полученный следующим образом: 1 мл испытываемого раствора А₁ помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объём раствора спиртом этиловым 96% до метки.

Пробоподготовка для сухого экстракта почек тополя краснонервного (экстракт № 2)

Около 0,3 г (точная навеска) сухого экстракта почек т. краснонервного (этанол) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл спирта этилового 96% при нагревании на кипящей водяной бане и доводили объём раствора до метки тем же растворителем (испытываемый раствор А₂). 2 мл испытываемого раствора А₂ помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 3% спиртового раствора алюминия (III) хлорида и доводили объём раствора до метки спиртом этиловым 96%

(испытываемый раствор В₁). В качестве раствора сравнения использовали раствор, полученный следующим образом: 2 мл испытываемого раствора А₂ помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объём раствора спиртом этиловым 96% до метки.

Методика качественного анализа препаратов почек тополя краснонервного методом тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии

При фитохимическом анализе почек т. краснонервного мы использовали метод тонкослойной хроматографии для изучения сухих экстрактов из его почек.

В исследовании использовали хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». Перед хроматографическим анализом пластинки помещали в термостат при температуре 100–105°C. В ходе исследования апробировали систему растворителей: хлороформ – спирт этиловый 96% (19:1).

Образцы извлечений наносили капилляром на линию старта, после этого пластинку погружали в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами растворителей в течение 24 ч. Хроматографирование осуществляли восходящим способом. Анализ считали завершённым, когда фронт растворителя достигал 7–8 см.

После извлечения из системы пластинки высушивали и оценивали визуально при дневном свете. Дополнительно пластинки просматривали в УФ-свете при 254 и 366 нм, затем обрабатывали щелочным раствором диазобензолсульфокислоты (ДСК).

В качестве физико-химических методов мы использовали метод прямой и дифференциальной спектрофотометрии.

Анализ проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в диапазоне 190–600 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Результаты спектрофотометрического определения обрабатывали, используя программу «WinAspect Excel».

Методика фармакологического исследования БАС и препаратов почек тополя краснонервного

Фармакологическое исследование было проведено в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России по теме: «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (с 14.05.2019 № Гос. регистрации АААА-А19-119051490148-7). Исследование одобрено Комитетом по биоэтике Самарского государственного медицинского университета (протокол № 222 от 07.04.2021 г.).

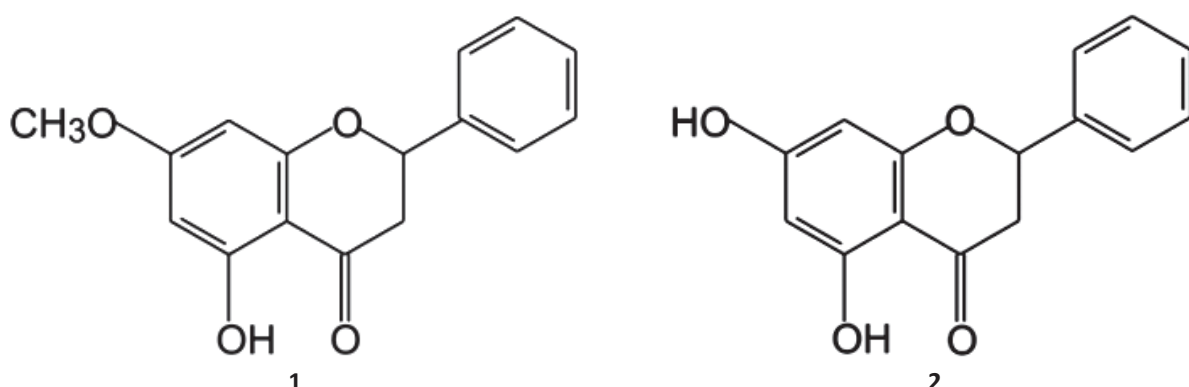


Рисунок 1 – Структурные формулы доминирующих флавоноидов почек фармакопейных видов рода Тополь

Примечание: 1 – пиностробин; 2 – пиноцембрин.

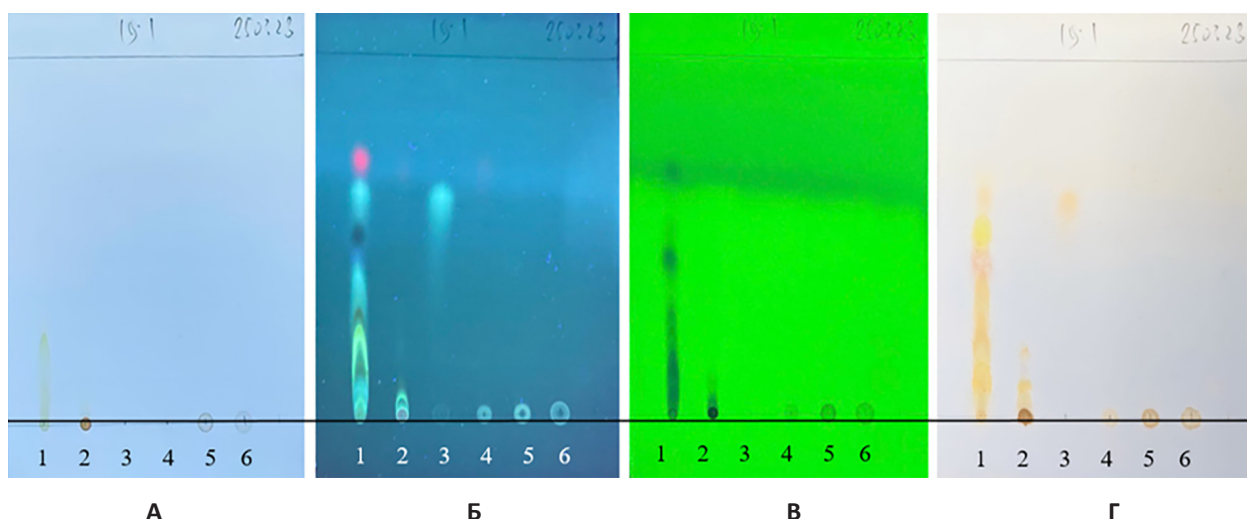


Рисунок 2 – Хроматограмма анализа экстрактов и шрота из почек тополя красной в системе растворителей хлороформ–спирт этиловый 96% (19:1)

Примечания: А – при дневном свете; Б – УФ-детекция в УФ-свете при длине волны 366 нм; В – УФ-детекция в УФ-свете при длине волны 254 нм; Г – обработка ДСК; 1 – сухой экстракт № 1 почек тополя красной; 2 – сухой экстракт № 2 почек тополя красной; 3 – пиностробин; 4 – шрот (этанол 96%); 5 – шрот (этанол 70%); 6 – шрот (этанол 40%).

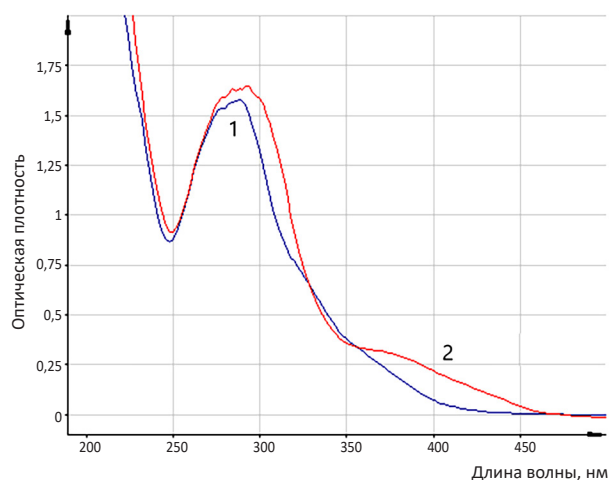


Рисунок 3 – Электронные спектры хлороформного экстракта почек т. красной (экстракт № 1)

Примечание: 1 – электронный спектр экстракта; 2 – электронный спектр экстракта в присутствии алюминия (III) хлорида.

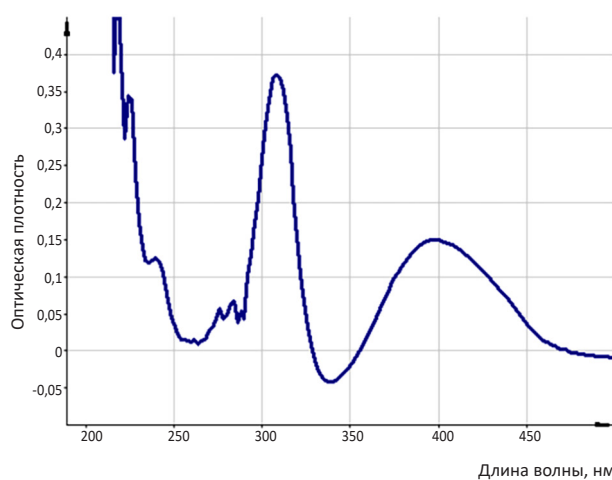


Рисунок 4 – Дифференциальный спектр хлороформного экстракта почек т. красной

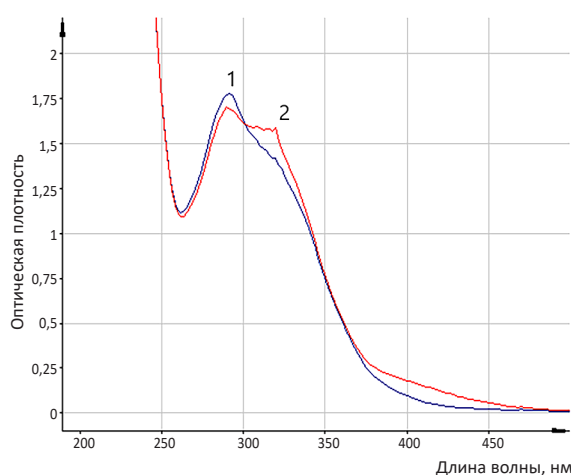


Рисунок 5 – Электронные спектры спиртового 70% экстракта почек т. красной (экстракт № 2)
Примечание: 1 – электронный спектр экстракта; 2 – электронный спектр экстракта в присутствии алюминия (III) хлорида.

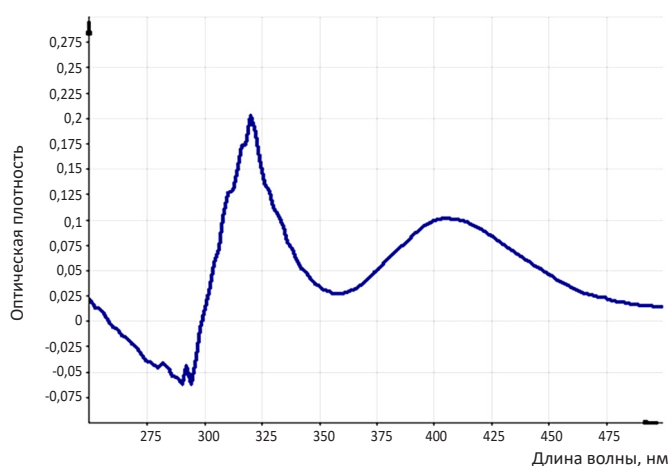


Рисунок 6 – Дифференциальный спектр спиртового 70% экстракта почек т. красной

Таблица 1 – Влияние внутрижелудочного введения СО пиностробина в дозе 1 мг/кг и сухих экстрактов почек т. красной № 1 и № 2 в дозе 10 мг/кг на экскреторную функцию почек intactных крыс ($M \pm m$, $n=10$)

Время, ч	Показатели	Контроль	Опыт 1: СО пиностробина, 1 мг/кг	Опыт 2: экстракт № 1, 10 мг/кг	Опыт 3: экстракт № 2, 10 мг/кг
4	Диурез, мл	1,72±0,11	1,97±0,03*	1,82±0,02	2,07±0,04*
	Диурез, %	100	115	106	120
	Достоверность	–	$p=0,047$	$p=0,698$	$p=0,011$
	Экскреция креатинина, мг	0,10±0,02	0,13±0,01	0,14±0,01	0,19±0,03*
	Экскреция креатинина, %	100	130	140	190
	Достоверность	–	$p=0,341$	$p=0,249$	$p=0,038$
24	Диурез, мл	2,58±0,10	2,52±0,25	2,38±0,39	3,02±0,11*
	Диурез, %	100	98	92	117
	Достоверность	–	$p=0,844$	$p=0,629$	$p=0,011$
	Экскреция креатинина, мг	1,50±0,29	2,39±0,15 *	2,31±0,42	2,79±0,51*
	Экскреция креатинина, %	100	159	147	186
	Достоверность	–	$p=0,019$	$p=0,229$	$p=0,047$

Примечание: СО – стандартный образец; * – $p < 0,05$, отличие данных опытной и контрольной группы достоверно.

Таблица 2 – Влияние внутрижелудочного введения препарата сравнения фуросемида в пороговой дозе 1 мг/кг на экскреторную функцию почек intactных крыс ($M \pm m$, $n=10$)

Время, ч	Показатели	Контроль	Фуросемид 1 мг/кг
4	Диурез, мл	1,97±0,13	3,81±0,22 *
	Диурез, %	100	193
	Достоверность	–	$p=0,001$
	Экскреция креатинина, мг	0,07±0,01	0,09±0,02
	Экскреция креатинина, %	100	129
	Достоверность	–	$p=0,361$
24	Диурез, мл	2,98±0,22	5,42±0,34 *
	Диурез, %	100	182
	Достоверность	–	$p=0,001$
	Экскреция креатинина, мг	1,19±0,11	1,58±0,13
	Экскреция креатинина, %	100	133
	Достоверность	–	$p=0,052$

Примечание: СО – стандартный образец; * – $p < 0,05$, отличие данных опытной и контрольной группы достоверно.

Изучение диуретической активности проводили на 60 белых аутбредных крысах обоего пола массой 200–220 г в хронических опытах с водным диурезом. Животные были получены из вивария при научно-исследовательском институте биотехнологий «БиоТех» ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Крысы содержались в клетках по 4 особи одного пола в условиях вивария на стандартном пищевом рационе и со свободным доступом к воде. В эксперименте участвовали 4 опытные и 2 контрольные группы животных. Распределение животных по группам производили методом жеребьевки. Каждая группа состояла из десяти животных ($n=10$). Контрольные и опытные животные получали внутривентрикулярно 3% водную нагрузку при помощи специального зонда. Опытным животным дополнительно вводили внутривентрикулярно сухие экстракты т. красной почки № 1 и № 2 в дозе 10 мг/кг, СО пиностробина – в дозе 1 мг/кг. В качестве препаратов сравнения были взяты классические диуретики: фуросемид в пороговой дозе 1 мг/кг (4 ч опыт) и гипотиазид в эффективной средней терапевтической дозе 20 мг/кг (24 ч опыт). После всех манипуляций животных помещали в обменные клетки для сбора мочи с возможностью доступа к корму и воде. Спустя 4 и 24 ч собирали полученные порции мочи. Определяли их объем (диурез), регистрировали креатининурию методом колориметрии на КФК-3 (АООТ «Загорский оптико-механический завод», Россия).

Статистическая обработка полученных результатов

В соответствии с общими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств была проведена комплексная статистическая обработка полученных данных фармакологических экспериментов с использованием адекватных методов статистического анализа, необходимого объема статистических выборок, при наличии препаратов сравнения. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 10.0 по критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферрони и Краскела-Уоллиса. Непараметрический критерий был выбран, т.к. выборка была небольшой, а распределение в выборке было ненормальным (W -критерий Шапиро-Уилка, при $p < 0,05$ считали, что анализируемое распределение отличалось от нормального). Уровень значимости принимали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные сухие экстракты на основе почек т. красной почки представляли собой сухой порошок золотисто-желтого (экстракт № 1) и кирпично-красного цвета (экстракт № 2) со специфическим запахом.

Анализ хроматографических профилей сухих

экстрактов из почек тополя красной и СО пиностробина в системе растворителей хлороформ–спирт этиловый 96% (19:1) позволил достоверно определить присутствие пиностробина в исследуемых образцах и предположить наличие и доминирование в исследуемом объекте фенольных соединений. ТСХ-анализ полученных сухих экстрактов позволил сделать вывод о разделении исходной суммы веществ (Рис. 2).

Доминирующие фенольные комплексы липофильной природы с пиностробинотом были изолированы в экстракт № 1, полученный на хлороформе. В гидрофильном экстракте (экстракт № 2) преобладали фенольные вещества гликозидной природы, в частности, катехины и ряд других не идентифицированных фенольных соединений на данном этапе (Рис. 2Б и 2Г).

Хроматографические профили водно-спиртовых извлечений из шрота сырья на спирте этиловом различной концентрации (40, 70, 96%) после двойной экстракции показали максимально обедненный состав (Рис. 2).

Таким образом, с использованием различных типов экстракции и растворителей разной полярности удалось разделить исходную сумму метаболитов на липофильный и гидрофильный комплексы. Нами получены два сухих экстракта на основе почек т. красной почки, отличающиеся по химическому составу. Необходимо отметить, что доминирующий компонент фармакопейных почек тополя – пиностробин – был локализован в первом липофильном (гидрофобном) экстракте.

Дальнейшее изучение сухих экстрактов проводили методом спектрофотометрии. Опираясь на известные ранее разработанные методы анализа почек фармакопейных видов тополя [1, 2, 4], нами были проанализированы прямые спектры экстрактов почек т. красной почки (Рис. 3 и 4).

Анализ спектральных кривых показал, что для экстракта № 1 характерно наличие в спектральной кривой одного выраженного максимума в области 288 ± 2 нм и небольшого «плеча» в области 320 ± 2 нм, что совпадает с максимумом поглощения извлечений из почек фармакопейных видов тополя (289 ± 2 нм) (Рис. 3). Подобное совпадение можно объяснить наличием основных доминирующих флавоноидов почек фармакопейных видов, в частности, пиностробина, наличие которого доказано нами ранее методом ТСХ.

Дифференциальная кривая поглощения имела два выраженных аналитических максимума при 308 ± 2 нм, характерного для фенилпропаноидов, и 400 ± 2 нм, характерного для суммы флавоноидных веществ, что свидетельствовало о наличии данных соединений в составе почек т. красной почки, как и у фармакопейных видов (Рис. 4).

Несмотря на разную полярность экстрактов,

спектральные характеристики гидрофильного экстракта № 2 имели значительные сходство с экстрактом № 1, полученным с использованием хлороформа (Рис. 5 и 6).

Опираясь на данные хроматографических исследований экстрактов (Рис. 2), можно предположить, что характеристики спектров сравниваемых экстрактов в значительной степени обусловлены наличием простых фенольных соединений, отличающихся полярностью за счет наличия или отсутствия гликозидных связей. Для более точного разделения в дальнейшем нами планируется проведение изучения и выделения БАВ из почек т. красной почки методом колоночной хроматографии.

Образцы сухих экстрактов почек т. красной почки № 1, № 2 и СО пиностробина были использованы для изучения выделительной функции почек в доклинических исследованиях на белых беспородных лабораторных крысах в дозе 10 мг/кг для экстрактов и 1 мг/кг для СО пиностробина (табл. 1).

При исследовании влияния СО пиностробина на экскреторную функцию почек было выявлено, что в 4-х ч хроническом эксперименте при однократном внутрижелудочном введении БАВ в дозе 1 мг/кг на фоне 3% водной нагрузки у животных опытной группы относительно показателей водного контроля было отмечено достоверное изолированное повышение диуреза (на 15%). Также за 24 ч опыта отмечено значительное изолированное достоверное повышение креатининуриза (на 59%) (табл. 1).

Следовательно, пиностробин в дозе 1 мг/кг на фоне 3% водной нагрузки вызывал ускоренную диуретическую реакцию преимущественно за счет увеличения канальцевой реабсорбции воды, о чем свидетельствовал рост диуреза в первые 4 ч опыта, а также отсроченное увеличение клубочковой фильтрации, что подтверждало увеличение креатининуриза за 24 ч.

В тоже время, при анализе влияния сухого экстракта № 2 на экскреторную функцию почек было установлено, что в 4-х ч хроническом эксперименте при однократном внутрижелудочном введении сухого экстракта в дозе 10 мг/кг на фоне 3% водной нагрузки у животных опытной группы относительно показателей водного контроля было отмечено достоверное повышение диуреза (на 20%) и значительное повышение креатининуриза (на 90%). В тоже время за 24 ч опыта также было зафиксировано достоверное повышение диуреза (на 17%) и значительное повышение креатининуриза (на 86%).

Таким образом, сухой экстракт почек т. красной почки № 2 в дозе 10 мг/кг в 4-х ч и суточном опыте вызывал ускоренную и пролонгированную диуретическую реакцию, как за счет увеличения канальцевой реабсорбции воды (рост почечной

экскреции воды), так и за счет увеличения клубочковой фильтрации (рост почечной экскреции креатинина).

Однако при изучении влияния сухого экстракта № 1 (хлороформ) почек т. красной почки на экскреторную функцию почек в 4-х и 24-х ч хроническом эксперименте при однократном внутрижелудочном введении в дозе 10 мг/кг на фоне 3% водной нагрузки у животных опытной группы относительно показателей водного контроля достоверных отличий выявлено не было.

Предположительно, это связано с тем, что данный экстрагент способствовал выделению из ЛРС сопутствующих липофильных соединений, которые не оказывали должного стимулирующего действия на клубочковый и канальцевый аппарат почек.

В свою очередь, препарат сравнения фуросемид в пороговой дозе 1 мг/кг в 4-х часовом эксперименте на фоне 3% водной нагрузки достоверно значительно увеличивал диурез (на 93%) в опытной группе животных относительно водного контроля (табл. 2). В суточном опыте фуросемид в аналогичной дозе продолжал поддерживать диурез на высоком уровне (на 82%).

Из этого следует, что СО пиностробина и сухой экстракт № 2 умеренно стимулировал почечную экскрецию воды, значительно уступая по силе препарату сравнения фуросемиду (вызывает максимальный диурез). Примечательно, что СО пиностробина и сухой экстракт № 2 обладают способностью стимулировать клубочковую фильтрацию, в отличие от фуросемида, обладающего исключительно канальцевым механизмом диуретического действия. Исходя из всего вышесказанного, данные препараты являются перспективными в плане разработки лекарственных средств с нефропротекторными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено наличие перспективного малоизученного представителя рода Тополь (*Populus* L.) – т. красной (*Populus rubrinervis* Hort. Alb.), выгодно отличающегося от фармакопейных видов тополей значительно большей фитомассой почек. Литературный обзор также позволил подтвердить имеющийся значительный ареал обитания данного представителя в Самарской области, что свидетельствует о перспективности заготовки данного вида сырья.

Проведено экстракционное разделение суммы веществ почек т. красной почки по полярности с помощью технологических методов – циркуляционной экстракции и перколяции.

Хроматографически доказано присутствие пиностробина как основного флавоноида фармакопейных видов тополей в хлороформном экстракте почек т. красной почки и отсутствие

его в спиртовом экстракте. Выявлено сходство спектральных кривых поглощения липофильных и гидрофильных сумм фенольных соединений экстрактов почек т. красной нервной разности полярности, а именно: наличие выраженного максимума поглощения при $289 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$ и «плеча» при $320 \pm 2 \text{ нм}$.

При однократном внутривенном введении БАВ пиностробина в дозе 1 мг/кг на фоне 3% водной нагрузки у животных опытной группы относительно показателей водного контроля за 4 ч опыта отмечалось изолированное повышение диуреза, в тоже время за 24 ч опыта – повышение креатининуриза. Следовательно, пиностробин в дозе 1 мг/кг вызывал ускоренную диуретическую реакцию, по силе уступая препарату сравнения фуросемиду в пороговой дозе 1 мг/кг . При этом пиностробин в указанной дозе проявлял отсроченную креатининурическую реакцию, что выгодно отличает его от препаратов сравнения.

В тоже время, при однократном внутривенном введении сухого экстракта № 2 в дозе 10 мг/кг на фоне 3% водной нагрузки у животных опытной группы относительно показателей водного контроля отмечалось умеренное достоверное повышение диуреза и значительное увеличение креатининуриза за 4 и 24 ч опыта за счет увеличения клубочковой фильтрации. Действие исследуемого препарата уступало по силе диуреза фуросемиду в пороговой дозе 1 мг/кг (4 ч опыт) и гипотиазиду в эффективной пороговой дозе 20 мг/кг (24 ч опыт), но превосходил препараты сравнения по стимуляции клубочковой фильтрации, способствуя росту креатининуриза.

При исследовании влияния сухого экстракта № 1 на экскреторную функцию почек за 4 и 24 ч отличий показателей опытной группы от контроля выявлено не было, в связи с чем требуются дальнейшие исследования дозозависимого эффекта данного препарата.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Урбанчик – сбор данных, проведение эксперимента, написание текста и составление списка литературы; В.А. Куркин – концепция и дизайн исследования, окончательное утверждение для публикации рукописи; Е.Н. Зайцева - концепция и дизайн фармакологических экспериментов, участие в описании и анализе полученных результатов, статистическая обработка результатов измерения, участие в написании рукописи и окончательном утверждении ее для публикации; В.М. Рыжов – сбор растительного материала для анализа, участие в проведении исследования; А.В. Дубищев – критический анализ исследования; А.С. Цибина – участие в проведении исследования, анализ литературы; А.И. Алтарева – участие в проведении исследования; Ю.Д. Сироткина – участие в проведении исследования. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Heinrich M., Sharma S.K., Suetterle U., Bhamra S.K. Herbal medicine use in the UK and Germany and pharmacy practice – A commentary // Res Social Adm Pharm. – 2023. – Vol. 19, No. 3. – P. 535–540. DOI: 10.1016/j.sapharm.2022.11.006
2. Talaei A., Forouzanfar F., Akhondzadeh S. Medicinal plants in the treatment of obsessive-compulsive disorder: a review // Curr Drug Discov Technol. – 2021. – Vol. 18, No. 1. – P. 8–16. DOI: 10.2174/1570163816666191011105050
3. Wang Z., Yang L. Chinese herbal medicine: Fighting SARS-CoV-2 infection on all fronts // J. Ethnopharmacol. – 2021. – Vol. 270. – Art. ID: 113869. DOI: 10.1016/j.jep.2021.113869
4. Куркин В.А., Авдеева Е.В., Куркина А.В., Правдивцева О.Е., Браславский В.Б., Егоров М.В., Рыжов В.М. Фенольные соединения как критерий подлинности и качества лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов // Традиционная медицина. – 2014. – № 4 (39). – С. 39–42.
5. Кодакова М.Н., Дубищев А.В. Сравнительная оценка фармакологического эффекта растительных препаратов семейства Ивовых // Медицинский вестник Башкортостана. – 2009. Т. 4, № 2. – С. 193–196.
6. Браславский В.Б., Куркин, В.А. Исследование электронных спектров флавоноидов тополя и прополиса // Медицинский альманах. – 2011. – № 2 (15). – С. 140–144.
7. Турецкова В.Ф., Лобанова, И.Ю., Рассыпнова, С.С., Талыкова, Н.М. Осина обыкновенная как перспективный источник получения препаратов противовоспалительного и противомикробного действия // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 5. – С. 106–111.
8. Shikov A.N., Narkevich I.A., Flisyuk E.V., Luzhanin V.G., Pozharitskaya O.N. Medicinal plants from the 14th

- edition of the Russian Pharmacopoeia, recent updates // J Ethnopharmacol. – 2021. – Vol. 268. – Art. ID: 113685. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113685
9. Матвеев Н.М., Кавеленова Л.М., Прохорова Н.В., Розно С.А. Особенности состава и жизненного состояния зеленых насаждений города Новокуйбышевска // Бюллетень Самарская Лука. – 2007. – Т. 16, № 1–2 (19–20). – С. 123–130.
 10. Хлебников В.Ф., Онуфриенко Н.Е., Смурова Н.В., Смурова Н.В. Перспективная форма тополя красной для озеленения населенных пунктов // Материалы научно-практической конференции (с международным участием) «Биоразнообразие и факторы, влияющие на экосистемы бассейна Днестра». – Тирасполь, 2018. – С. 220–222.
 11. Kis B., Pavel I.Z., Avram S., Moaca E.A., Herrero San Juan M., Schwiebs A., Radeke H.H., Muntean D., Diaconeasa Z., Minda D., Oprean C., Bojin F., Dehelean C.A., Soica C., Danciu C. Antimicrobial activity, in vitro anticancer effect (MCF-7 breast cancer cell line), antiangiogenic and immunomodulatory potentials of *Populus nigra* L. buds extract // BMC Complement. Med. Ther. – 2022. – Vol. 22, No. 1. – Art. ID: 74. DOI: 10.1186/s12906-022-03526-z
 12. Stanciuskaite M., Marksa M., Babickaite L., Majiene D., Ramanauskiene K. Comparison of Ethanolic and Aqueous *Populus balsamifera* L. Bud Extracts by Different Extraction Methods: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities // Pharmaceuticals (Basel). – 2021. – Vol. 14, No. 10. – Art. ID: 1018. DOI: 10.3390/ph14101018
 13. Dudonné S., Poupard P., Coutière P., Woillez M., Richard T., Mérillon J.M., Vitrac X. Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging // J Agric Food Chem. – 2011. – Vol. 59, No. 9. – P. 4527–4536. DOI: 10.1021/jf104791t
 14. Stanciuskaite M., Marksa M., Liaudanskas M., Ivanauskas L., Ivaskiene M., Ramanauskiene K. Extracts of Poplar Buds (*Populus balsamifera* L., *Populus nigra* L.) and Lithuanian Propolis: Comparison of Their Composition and Biological Activities // Plants (Basel). – 2021. – Vol. 10, No. 5. – Art. ID: 828. DOI: 10.3390/plants10050828
 15. Bélanger A., Grenier A., Simard F., Gendreau I., Pichette A., Legault J., Pouliot R. Dihydrochalcone Derivatives from *Populus balsamifera* L. Buds for the Treatment of Psoriasis // Int J Mol Sci. – 2019. – Vol. 21, No. 1. – Art. ID: 256. DOI: 10.3390/ijms21010256
 16. Pannucci E., D'Eliseo D., Ieri F., Romani A., Santi L., Bernini R., Sabatti M., Velotti F. Perspectives on *Populus* spp. (*Salicaceae*) bud extracts as antioxidant and anti-inflammatory agents // Nat Prod Res. – 2022. – Vol. 36, No. 6. – P. 1648–1652. DOI: 10.1080/14786419.2021.1896512
 17. Stanciu G., Aonofriesei F., Lupsor S., Oancea E., Mititelu M. Chemical composition, antioxidant activity, and antibacterial activity of black poplar buds' hydroalcoholic macerates from dobrogea area // Molecules. – 2023. – Vol. 28, No. 13. – Art. ID: 4920. DOI: 10.3390/molecules28134920
 18. Pobłocka-Olech L., Migas P., Krauze-Baranowska M. TLC determination of some flavanones in the buds of different genus *Populus* species and hybrids // Acta Pharm. – 2018. – Vol. 68, No. 2. – P. 199–210. DOI: 10.2478/acph-2018-0018
 19. Kis B., Avram S., Pavel I.Z., Lombrea A., Buda V., Dehelean C.A., Soica C., Yerer M.B., Bojin F., Folescu R., Danciu C. Recent advances regarding the phytochemical and therapeutic uses of *Populus nigra* L. buds // Plants (Basel). – 2020. – Vol. 9, No. 11. – Art. ID: 1464. DOI: 10.3390/plants9111464
 20. Куркин В.А. Актуальные аспекты стандартизации сырья и препаратов, содержащих фенольные соединения // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2022. – Т. 12, № 2. – С. 127–141.
 21. Kuš P., Jerković I., Jakovljević M., Jokić S. Extraction of bioactive phenolics from black poplar (*Populus nigra* L.) buds by supercritical CO₂ and its optimization by response surface methodology // J Pharm Biomed Anal. – 2018. – Vol. 152. – P. 128–136. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.01.046
 22. Elbatreek M.H., Mahdi I., Ouchari W., Mahmoud M.F., Sobeh M. Current advances on the therapeutic potential of pinocembrin: An updated review // Biomed. Pharmacother. – 2023. – Vol. 157. – Art. ID: 114032. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.114032
 23. Patel N.K., Jaiswal G., Bhutani K.K. A review on biological sources, chemistry and pharmacological activities of pinostrobin // Nat Prod Res. – 2016. – Vol. 30, No. 18. – P. 2017–2027. DOI: 10.1080/14786419.2015.1107556
 24. Sayre C.L., Alrushaid S., Martinez S.E., Anderson H.D., Davies N.M. Pre-clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of selected chiral flavonoids: pinocembrin and pinostrobin // J Pharm Pharm Sci. – 2015. – Vol. 18, No. 4. – P. 368–395. DOI: 10.18433/j3bk5t
 25. González A.S., Soto Tellini V.H., Benjumea Gutiérrez D.M. Study of the dermal anti-inflammatory, antioxidant, and analgesic activity of pinostrobin // Heliyon. – 2022. – Vol. 8, No. 9. – Art. ID: e10413. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e10413
 26. Shen X., Liu Y., Luo X., Yang Z. Advances in biosynthesis, pharmacology, and pharmacokinetics of pinocembrin, a promising natural small-molecule drug // Molecules. – 2019. – Vol. 24, No. 12. – Art. ID: 2323. DOI: 10.3390/molecules24122323
 27. Zhao L., Yao L., Chen R., He J., Lin T., Qiu S., Chen G., Chen H., Qiu S.X. Pinostrobin from plants and propolis against human coronavirus HCoV-OC43 by modulating host AHR/CYP1A1 pathway and lipid metabolism // Antiviral Res. – 2023. – Vol. 212. – Art. ID: 105570. DOI: 10.1016/j.antiviral.2023
 28. Sun X., Liu X., Chen S. The pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of pinostrobin in rats: ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear trap quadrupole orbitrap mass spectrometry studies // Front Pharmacol. – 2020. – Vol. 11. – Art. ID: 574638. DOI: 10.3389/fphar.2020.574638
 29. Pobłocka-Olech L., Inkielewicz-Stepniak I., Krauze-Baranowska M. Anti-inflammatory and antioxidative effects of the buds from different species of *Populus* in human gingival fibroblast cells: role of bioflavanones // Phytomedicine. – 2019. – Vol. 56. – P. 1–9. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.08.015
 30. Debbache-Benaid N., Atmani-Kilani D., Schini-Keir V.B., Djebbli N., Atmani D. Pharmacological potential of

Populus nigra extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent // Asian Pac J Trop Biomed. – 2013. – Vol. 3, No. 9. – P. 697–704. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60141-0

31. Рудник А.М., Ковальов В.М., Бородин Н.В. Дослідження хімічного складу і антибактеріальної активності ефірної олії бруньок *Populus Simonii* Carr. // Фармацевтичний часопис. – 2009. – № 3. – С. 12–16.
32. Денис А.І., Вронська Л.В., Чубка М.Б., Грошовий Т.А. Standardization of tablets on the basis of dry extract of simon's poplar leaves // Актуальні питання

фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2013. – № 2 (12). – С. 044–049.

33. Михайлова Т.С., Куприянова Е.А., Куркин В.А., Рыжов В.М., Тарасенко Л.В., Помогайбин А.В. Исследование морфологических признаков почек некоторых видов растений рода *Populus* // Материалы докладов III Межвузовской студенческой научно-практической конференции «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы» (Самара, 29 октября 2018 года). – Изд-во: СамГМУ, 2018. – С. 116–122.

АВТОРЫ

Урбанчик Елена Александровна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармакологии имени заслуженного деятеля науки РФ профессора А.А. Лебедева, ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-0725-2000. E-mail: e.a.urbanchik@samsmu.ru

Куркин Владимир Александрович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7513-9352. E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Зайцева Елена Николаевна – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии имени заслуженного деятеля науки РФ профессора А.А. Лебедева, ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. ORCID: 0000-0001-5689-2077. E-mail: e.n.zaitceva@samsmu.ru

Рыжов Виталий Михайлович – кандидат фармацевтических наук, доцент, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-8399-9328. E-mail: v.m.ryzhov@samsmu.ru

Дубищев Алексей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры фармакологии имени заслуженного деятеля науки РФ профессора А.А. Лебедева, ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. ORCID: 0000-0003-2597-0815. E-mail: a.v.dubischev@samsmu.ru

Цибина Анастасия Сергеевна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармакологии имени заслуженного деятеля науки РФ профессора А.А. Лебедева, ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. ORCID: 0000-0002-0384-5522. E-mail: a.s.tsibina@samsmu.ru

Алтарева Анастасия Игоревна – аспирант кафедры фармакологии имени заслуженного деятеля науки РФ профессора А.А. Лебедева, ФГБОУ ВО СамГМУ» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-2287-1192. E-mail: nastya9622@mail.ru

Сироткина Юлия Дмитриевна – студентка 6-го курса Института Клинической медицины, староста студенческого научного кружка кафедры фармакологии имени заслуженного деятеля науки РФ профессора А.А. Лебедева, ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0009-0001-8841-9636. E-mail: ju.d.sirotkina@samsmu.ru

УДК 616.71-007.234:542.943-92'78



Изучение возможностей фармакологической коррекции легочной гипертензии, индуцированной гипоксией, с использованием соединения фенольной природы с лабораторным шифром КУД975

Л.В. Корокина

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

E-mail: Korokina@mail.ru

Получена 30.05.2023

После рецензирования 15.09.2023

Принята к печати 30.10.2023

Цель. Изучение фармакологической активности селективного ингибитора аргиназы-2 и тромбина из группы соединений фенольной природы с лабораторным шифром КУД975 на модели артериальной легочной гипертензии, индуцированной гипоксией.

Материалы и методы. Для моделирования легочной гипертензии (ЛГ) животных помещали в нормобарическую гипоксическую камеру и подвергали 5 неделям гипоксии с содержанием кислорода в воздухе 10%. После 3-х недель гипоксии животным вводили исследуемое соединение КУД975 (внутрижелудочно в дозе 2 мг/кг 1 раз в сут в течение 2 недель). В качестве препарата сравнения использовали L-норвалин (внутрижелудочно 20 мг/кг). Для оценки развития ЛГ и ее коррекции проводили измерение показателей кардиогемодинамики, анализ газового состава крови, изучение количества циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток (ПЭК), количественную ПЦР с оценкой экспрессии мРНК VEGF-R2, SDF-1 (стромальный фактор роста-1) и MCP-1 (моноцитарный хемоаттрактантный белок-1). Далее проводили гистологическое исследование легких и сердца, оценивали степень отека легких и концентрацию кардиотрофина-1 и предсердного натрийуретического пептида.

Результаты. Введение исследуемого соединения фенольной природы с лабораторным шифром КУД975, как и препарата сравнения L-норвалина, привело к уменьшению систолического давления в полости правого желудочка сердца на фоне моделирования ЛГ. В настоящем исследовании показано снижение количества циркулирующих ПЭК более чем в 2 раза в группе животных с моделированием циркуляторной легочной гипертензии, индуцированной ЛГ ($171,3 \pm 12,1$), в сравнении с группой интактных животных ($296,1 \pm 31,7$; $p=0,0018$). Восстановление ПЭК было отмечено в группе животных, получавших КУД975 и L-норвалин, до $247,5 \pm 34,2$ ($p=0,0009$ в сравнении с легочной артериальной гипертензией (ЛАГ) и $235,6 \pm 36,4$ ($p=0,008$ в сравнении с ЛАГ) соответственно. Исследуемые соединения оказывали протективное действие, статистически значимо повышая экспрессию мРНК VEGF-R2 и снижая экспрессию мРНК SDF-1, а также снижая коэффициент влажности легких и концентрации кардиотрофина-1 и предсердного натрийуретического пептида и предотвращая сосудистое ремоделирование, вызванное гипоксией.

Заключение. При изучении фармакологической активности показано, что соединение фенольной природы с лабораторным шифром КУД975 нормализует показатели гемодинамики, уменьшает признаки ремоделирования сердца и легочных сосудов и обладает выраженным эндотелиопротективным действием на модели ЛГ, индуцированной гипоксией, и превосходит активность препарата сравнения L-норвалин.

Ключевые слова: легочная гипертензия; эндотелиальная дисфункция; оксид азота; гетероциклические кислоты; эндотелий; аргиназа-2; тромбин

Список сокращений: ЛГ – легочная гипертензия; ЛАГ – легочная артериальная гипертензия; ХТЭЛГ – хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; СДПЖ – систолическое давление в полости правого желудочка; СрДПЖ – среднее давление в полости правого желудочка; ДДПЖ – диастолическое давление в полости правого желудочка; ЧСС – частота сердечных сокращений; ПЭК – предшественники эндотелиальных клеток; SDF-1 – стромальный фактор роста-1; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1; ПЖ – правый желудочек; ЛЖ – левый желудочек; PaO_2 – парциальное давление кислорода; $PaCO_2$ – парциальное давление углекислого газа; ЭК – эндотелиальная клетка; МП – межжелудочковая перегородка; ЭД – эндотелиальная дисфункция.

Для цитирования: Л.В. Корокина. Изучение возможностей фармакологической коррекции легочной гипертензии, индуцированной гипоксией, с использованием соединения фенольной природы с лабораторным шифром КУД975. *Фармация и фармакология*. 2023;11(4):312-323. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-312-323

© Л.В. Корокина, 2023

For citation: L.V. Korokina. Studying the possibilities of pharmacological correction of hypoxia-induced pulmonary hypertension using a phenolic compound with a laboratory cypher KUD975. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(4):312-323. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-312-323

Studying the possibilities of pharmacological correction of hypoxia-induced pulmonary hypertension using a phenolic compound with a laboratory cypher KUD975

L.V. Korokina

Belgorod State National Research University
85, Pobeda Str., Belgorod, Russia, 308015

E-mail: Korokina@mail.ru

Received 30 May 2023

After peer review 15 Sep 2023

Accepted 30 Oct 2023

The aim of our work was to study a pharmacological activity of a selective arginase-2 and thrombin inhibitor from a phenolic compounds group with a laboratory cypher KUD975 on a model of arterial pulmonary hypertension induced by hypoxia.

Materials and methods. To simulate pulmonary hypertension (PH), animals were placed in a normobaric hypoxic chamber and subjected to 5 weeks of hypoxia with an oxygen content of 10% in the air. After 3 weeks of hypoxia, the animals were administered with the test compound KUD975 (intragastrically, at a dose of 2 mg/kg once a day for 2 weeks). L-norvaline (intragastrically, 20 mg/kg) was used as a reference drug. To assess the development and correction of PH, measurements of cardiohemodynamics, analysis of blood gas composition, study of the number of circulating endothelial precursor cells (EPCs), quantitative PCR assessing the expression of mRNA VEGF-R2, SGF-1 (stromal growth factor-1) and MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). Next, a histological examination of the lungs and heart was performed, the degree of pulmonary edema and the concentration of cardiotrophin-1 and atrial natriuretic peptide were assessed.

Results. The administration of the studied phenolic compound with laboratory cypher KUD975, as well as the reference drug L-norvaline, led to a decrease in the right ventricular systolic pressure against the background of modeling PH. The present study shows a more than twice-fold decrease in the number of circulating (EPCs) in the animals group with modeling a hypoxia-induced circulatory PH (171.3 ± 12.1) in comparison with the group of intact animals (296.1 ± 31.7 ; $p=0.0018$). The recovery of EPCs was noted in the animals group administered with KUD-975 and L-norvaline, up to 247.5 ± 34.2 ($p=0.0009$ compared with a pulmonary arterial hypertension (PAH) and 235.6 ± 36.4 ($p=0.008$ compared to PAH), respectively. The studied compounds had a protective effect by statistically significantly increasing the expression of VEGF-R2 mRNA and decreasing the expression of SGF-1 mRNA, reducing the lung moisture coefficient and the concentrations of cardiotrophin-1 and atrial natriuretic peptide and preventing vascular remodeling caused by hypoxia.

Conclusion. When studying the pharmacological activity, it was shown that the phenolic compound with the laboratory cypher KUD975 normalizes hemodynamic parameters, reduces the signs of remodeling of the heart and pulmonary vessels and has a pronounced endothelial protective effect on the model of hypoxia-induced PH, and is superior to the activity of the reference drug L-norvaline.

Keywords: pulmonary hypertension; endothelial dysfunction; nitric oxide; heterocyclic acids; endothelium; arginase-2; thrombin

Abbreviations: PH – pulmonary hypertension; PAH – pulmonary arterial hypertension; CTPH – chronic thromboembolic pulmonary hypertension; COPD – chronic obstructive pulmonary disease; RVAP – right ventricular average pressure; RVSP – right ventricular systolic pressure; HR – heart rate; EPCs – endothelial precursor cells; SDF-1 – stroma-derived growth factor; VEGF – vascular endothelial growth factor; MCP-1 – monocyte chemoattractant protein-1; RV – right ventricle; LV – left ventricle; PaO_2 – oxygen partial pressure; PaCO_2 – carbon dioxide partial pressure; EC – endothelial cell; MP – interventricular septum; ED – endothelial dysfunction.

ВВЕДЕНИЕ

Легочная гипертензия (ЛГ) – прогрессирующее и часто смертельное сердечно-легочное заболевание, характеризующееся повышением давления в легочной артерии, структурными изменениями в малом круге кровообращения и формированием сосудистых осложнений [1].

ЛГ в целом состоит из смешанной группы нарушений, все из которых, в конечном итоге, приводят к повышению легочного артериального давления (АД). ЛГ клинически классифицирована 6-м Всемирным симпозиумом по легочной гипертензии (WSPH, 2018) как ЛГ 1-й группы в зависимости от основной этиологии. Другие клинические подгруппы включают ЛГ 2-й

группы, которая развивается из-за основной сердечной недостаточности (сниженная или сохраненная фракция выброса), порока клапанов сердца или врожденных пороков сердца [2]. ЛГ 3-й группы возникает из-за заболеваний легких или гипоксии. ЛГ 4-й группы развивается из-за обструкции легочной артерии, которая также включает хроническую тромбоэмболическую ЛГ (ХТЭЛГ) [3]. ХТЭЛГ характеризуется хронической организацией тромбов в легочных артериолах с последующим фиброзом и стенозом сосудов [4]. ЛГ 5-й группы представляет собой сложную когорту, часто обусловленную многофакторной этиологией [3].

Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ)

является особенно сложной формой ЛГ, поскольку она включает прогрессирующий гиперпролиферативный процесс, при отсутствии лечения приводящий к правожелудочковой недостаточности и смерти [5, 6].

Патофизиология ЛАГ сложна и вариабельна, учитывая множество молекулярных механизмов и лежащих в основе нарушений, вовлеченных в патогенез. Однако наиболее распространенными патологическими признаками, независимо от первоначального этиологического фактора, являются дисфункция эндотелиальных клеток легочной артерии, пролиферация и миграция гладкомышечных клеток легочной артерии и нарушение регуляции активности фибробластов [5, 7].

Вызванная гипоксией ЛГ, является потенциально тяжелым и смертельным заболеванием легких. Известно, что хроническая гипоксия приводит к ремоделированию легочных сосудов, ЛГ и гипертрофии правого желудочка (ПЖ) сердца с последующим риском развития правожелудочковой недостаточности. Хронические заболевания легких, такие как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), муковисцидоз и бронхолегочная дисплазия, могут привести к диффузной хронической альвеолярной гипоксии [8]. Развитие ЛГ связано со значительной заболеваемостью и смертностью у этих пациентов [9, 10].

Несмотря на это, в настоящее время существует несколько методов лечения ЛГ, а стратегии профилактики остаются в значительной степени неизвестными.

ЦЕЛЬ. Изучение фармакологической активности селективного ингибитора аргиназы-2 и тромбина из группы соединений фенольной природы с лабораторным шифром КУД975 на модели артериальной легочной гипертензии, индуцированной гипоксией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Все экспериментальные исследования проведены в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России от 23.08.2010 № 708н, при строгом соблюдении Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей (Директива 2010/63/ЕС). Экспериментальные исследования одобрены Биоэтической комиссией Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 11/9 от 12 февраля 2022 года). Вивисекцию проводили в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (CETS № 123).

В качестве основной тест-системы были использованы мыши C57Bl/6J ($n=40$) полученные

из Экспериментально-биологической клиники НИУ «БелГУ». После прохождения 14-дневного карантинного режима, мыши были стратифицированы по массе и рассажены в отдельные конвенциональные клетки в соответствии с принадлежностью к экспериментальной группе. До и во время выполнения исследования животные содержались в помещениях с искусственным освещением (режим 12 ч/12 ч) при температуре 21–23°C, влажности 38–50% и имели свободный доступ к корму и воде.

Дизайн исследования

Для моделирования ЛГ животных помещали в нормобарическую гипоксическую камеру (авторская разработка) с контролем газового состава воздуха. Экспериментальных мышей подвергали 3 неделям гипоксии с содержанием кислорода в воздухе 10%. Нормобарическую гипоксическую камеру открывали на 1 ч один раз в 3 дня для замены подстилки, бутылок с водой и корма. Использовали мышей дикого типа (C57Bl/6) обоего пола (возраст 10–12 недель), животных равномерно рандомизировали по полу (самки и самцы в группе в соотношении 50/50) и весу (вес животных в группе в диапазоне 24±2 грамма). Животных контрольной группы содержали в нормобарической гипоксической камере в условиях нормоксии. После 3 недель нахождения животных в гипоксической камере, они получали различные лекарственные соединения еще в течение 2 недель в тех же условиях окружающей среды. Таким образом, животные экспериментальных групп находились в гипоксической камере в течении 5 недель [11].

Исследуемые соединения

В работе изучена фармакологическая активность соединения фенольной природы с лабораторным шифром КУД975 (метилловый эфир 2-((1-гидроксинафталин-2-ил)тио)ацетил)-D-пролина). Соединение синтезировано группой ученых под руководством доктора химических наук Кудрявцева Константина Викторовича (РНИМУ им. Н.И. Пирогова). На рисунке 1 представлена структурная формула исследуемого соединения.

В качестве препарата сравнения использовали ингибитор аргиназ L-норвалин ($C_5H_{11}NO_2$, Clearsynth, Индия).

КУД975 вводили внутривентрикулярно в дозе 2 мг/кг один раз в день в течении 2 недель. В качестве препарата сравнения использовали L-норвалин в дозе 20 мг/кг внутривентрикулярно.

Таким образом, были сформированы следующие экспериментальные группы:

1. Контроль (1% крахмальный раствор внутривентрикулярно);
2. ЛАГ, индуцированная гипоксией;
3. ЛАГ+КУД975 в дозе 2 мг/кг 14 дней;
4. ЛАГ+L-норвалин в дозе 20 мг/кг 14 дней.

Расчет дозирования и режимы введения исследуемых соединений и препаратов сравнения основаны на их эффективности в экспериментальных исследованиях, проведенных ранее в области фармакологической коррекции эндотелий ассоциированной патологии [12–15].

Перерасчет доз произведен с использованием межвидовых коэффициентов, а дизайн проведенных экспериментальных исследований осуществлен в соответствии с рекомендациями по доклиническим исследованиям^{1,2}.

Измерение давления в полости правого желудочка сердца, анализ газового состава крови

Давление в ПЖ сердца и газовый состав венозной крови измеряли у мышей, находящихся под наркозом (2–2,5% изофлурана в 100% кислороде), через 5 недель от начала эксперимента. Для этого на шею мышей был сделан небольшой кожный разрез и выделена правая наружная яремная вена, которая была катетризирована полиэтиленовым (PE 10) катетером. Далее катетер был проведен в полость ПЖ сердца. У каждого животного АД в полости ПЖ регистрировали непрерывно с частотой дискретизации 1 кГц в течение не менее 30 сек с помощью пьезоэлектрического датчика давления и полиграфа MP-150 (BIOPAC Systems, Inc. США). Правильное анатомическое положение наконечника катетера контролировали путем постоянного мониторинга кривой сигнала давления. Определяли систолическое давление в полости правого желудочка (СДПЖ), среднее давление в полости правого желудочка (СрДПЖ), диастолическое давление в полости правого желудочка (ДДПЖ), частоту сердечных сокращений (ЧСС), $dP/dt \max$, $dP/dt \min$. Показатели гемодинамики определяли с помощью аппаратного комплекса Биопас MP-150 (BIOPAC Systems, Inc. США) и компьютерной программы AcqKnowledge 3.8.1 (США). После измерения показателей гемодинамики животное выводили из эксперимента путем передозировки этилового эфира, производили забор крови для анализа газового состава (парциальное давление кислорода и углекислого газа) [11].

Изучение количества циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток

Для измерения уровня циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток (ПЭК) мы использовали метод культивирования клеток и окрашивания, который был описан в исследовании Pan Y. и соавт. [16]. Мононуклеарные клетки выделяли

из периферической крови центрифугированием (центрифуга Eppendorf 5430R, Германия) в растворе Histopaque-1083 (раствор, содержащий полисахарозу и диатризоат натрия, доведенный до плотности 1,083 г/мл) в соответствии с инструкциями производителя (Sigma Chemical, США). Выделенные мононуклеарные клетки высевали в трех повторениях на 96-луночные планшеты, покрытые 1%-ным желатином, в базальную среду для эндотелиальных клеток (Thermo Scientific, США), дополненную 2% фетальной бычьей сывороткой, пенициллином (100 Ед/мл) и стрептомицином (100 мкг/мл). После 2 дней культивирования прилипшие клетки тщательно промывали средой и совместно окрашивали Dil AcLDL (Thermo Scientific, США).

Количественная ПЦР

Для исследования влияния исследуемых препаратов на молекулярные механизмы развития ЛГ нами поставлена полимеразная цепная реакция в реальном времени с целью определения экспрессии мРНК VEGF-R2, SDF-1 (стромальный фактор роста-1) и MCP-1 (моноцитарный хемоаттрактантный белок-1). Для проведения количественной ПЦР в реальном времени часть легкого гомогенизировали и 10 мин инкубировали при 37°C в растворе «Extract RNA». После лизирования образца в реагенте его подвергали хлороформной чистке, надосадочную пробу собирали и промывали изопропиловым спиртом и 70%-ным этиловым спиртом. Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре IMPLEN NanoPhotometer® NP80 (IMPLEN, Германия) и доводили до концентрации 300 нг/мкл добавлением деионизированной воды (ЗАО Евrogen, Россия). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLVRTSK021 в соответствии с протоколом фирмы-производителя (ЗАО Евrogen, Россия). Уровень экспрессии гена оценивали относительно значений референсного гена Gapdh. Расчет экспрессии в конкретной точке проводили по формуле [8]:

Экспрессия гена = $[(Ct(Gapdh))/Ct(\text{Ген интереса})]$.

Методика гистологического исследования

Для гистологического исследования органы (сердце и легкие) извлекали и фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Затем материал заливали в стандартном режиме в парафин в автомате карусельного типа «STP-120» (Microm International GmbH, Германия). Исследование гистологических препаратов выполняли под микроскопом Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Германия), морфометрию выполняли с использованием программы Image J 1.54d. Определяли толщину стенки легочной артерии, были оценены легочные сосуды вблизи альвеол и определены диаметры 20 сосудов на предметном стекле. От каждого животного оценивали по 5 срезов. Одновременно проведена оценка количества затромбированных сосудов в поле зрения (увеличение микроскопа 400-кратное).

¹ Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: учеб. пособие для системы послевуз. проф. образования врачей / Науч. центр экспертизы средств мед. применения; под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: Изд-во Медицина: Изд-во Шико, 2005. – 826 с.

² Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: в 2 ч. / Науч. центр экспертизы средств мед. применения; редкол.: А.Н. Мионов (пред.) [и др.]. – Москва: «Гриф и К», 2012. – Ч. 1. – 940 с.

На каждом предметном стекле, окрашенном гематоксилином и эозином, оценивали приблизительно 20 сосудов перибронхиальной легочной артерии (увеличение микроскопа $\times 400$). Степень окклюзии определяли, как соотношение между внешней и внутренней (т.е. просветной) окружностями каждого сосуда. Степень гипертрофии миокарда ПЖ сердца определяли с помощью программного обеспечения для анализа изображений MCID 7.0 Image Research. С этой целью делали горизонтальный разрез через сердце мыши на уровне желудочков, полученные срезы сканировали с помощью инструмента рисования левый и правый желудочки были разделены вручную тонкой линией одинаковым образом для всех срезов. Затем проведенный попиксельный анализ площадей ПЖ и ЛЖ с межжелудочковой перегородкой (МП). Результаты представлены в виде соотношения ПЖ/(ЛЖ+МП).

Определение степени отека легких

При выведении животных из эксперимента был произведен забор легких и их разделение на отдельные доли. Затем определяли массу доли легкого до и после сушки в термостате при 70°C в течение 72 ч. Результаты выражали в виде отношения массы легких до и после сушки.

Биохимические маркеры

Кардиотрофин-1 (КТ-1) и предсердный натрийуретический пептид (ПНП) измеряли в сыворотке крови с помощью наборов для ИФА (ELM-Cardiotrophin-1/EIA-ANP-1, RayBiotech, Norcross, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Статистический анализ

Данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Данные с нормальным распределением сравнивались с использованием обычного одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с пост-тестом Тьюки. Данные с ненормальным распределением сравнивались с тестом Крускала–Уоллеса и тестом Данна post hoc. Различия были определены на уровне значимости $p < 0,05$. Экспериментальные данные представлены в виде значений $M \pm SD$. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.2.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Моделирование ЛГ в гипоксической камере приводило к статистически значимому увеличению СДПЖ практически в 2 раза, ДДПЖ более чем в 2 раза, максимальной скорости сокращения ($dP/dt \max$) и минимальной скорости сокращения ($dP/dt \min$) и не приводило к статистически значимому изменению ЧСС (табл. 1). Введение исследуемого соединения с лабораторным шифром КУД975, как и препарата сравнения L-норвалина, привело к статистически значимому снижению всех

исследуемых показателей, причем показатель, $dP/dt \max$ в группах животных с введением исследуемых препаратов максимально приближался к таковым значениям в группе интактных животных (табл. 1).

Для характеристики состояния сосудистого эндотелия произведена оценка количества циркулирующих ПЭК, которое статистически значимо снижалось у животных с циркуляторной ЛГ, индуцированной гипоксией (Рис. 1).

В настоящем исследовании показано снижение количества циркулирующих ПЭК более чем в 2 раза в группе животных с моделированием циркуляторной ЛГ, индуцированной гипоксией ($171,3 \pm 12,1$) в сравнении с группой интактных животных ($296,1 \pm 31,7$; $p = 0,0018$). В группах животных, которым вводили исследуемые соединения, количество циркулирующих ПЭК статистически значимо повышалось (Рис. 2).

При анализе результатов исследования газового состава крови обнаружена схожая картина – статистически значимое снижение парциального давления кислорода (PaO_2) на фоне статистически значимого повышения парциального давления углекислого газа ($PaCO_2$) в группе животных с ЛГ. Соединения КУД975 и L-норвалин статистически значимо (в сравнении с группой ЛАГ) и сопоставимо восстанавливали значения показателей газового состава крови у животных экспериментальных групп (Рис. 3).

Установлено, что уровни экспрессии мРНК VEGF-R2 в легких были статистически значимо снижены, а уровни SDF-1 статистически значимо повышены при ЛАГ. При применении соединения КУД975 и L-норвалина обнаружено статистически значимое повышение экспрессии мРНК VEGF-R2 и снижение экспрессии мРНК SDF-1. При этом степень увеличения экспрессии мРНК VEGF-R2 в группе животных, получавших КУД975, была статистически значимо выше таковой в группе животных, получавших L-норвалин. В то же время, исследуемые соединения не влияли на экспрессию мРНК MCP-1 при моделировании ЛГ, индуцированной гипоксией (Рис. 4).

Степень отека легких в экспериментальных группах оценивали по соотношению массы влажных и сухих легких. Моделирование легочной гипертензии с помощью гипоксии увеличивало соотношение веса влажного легкого к сухому на 33%. Степень отека легкого была статистически значимо уменьшена при применении соединения КУД975 и L-норвалина. Значение данного показателя в экспериментальных группах было ниже, чем в группе животных с ЛГ. Значение коэффициента влажности в группе животных с применением КУД975, максимально приближалось к целевым значениям, установленным в группе интактных животных (Рис. 5).

При исследовании концентрации в плазме крови цитокинов КТ-1 и ПНП установлено, что уровень обоих факторов статистически значимо повышался при моделировании ЛГ с помощью гипоксии. Так, в группе животных с ЛГ без лечения (ЛАГ)

концентрации КТ-1 и ПНП увеличилась более чем в 5 раз (Рис. 6). Применение соединений КУД975 и L-норвалина привело к статистически значимому снижению концентраций КТ-1 и ПНП в плазме крови.

Гистологическая картина легких в группе животных с циркуляторной ЛГ, индуцированной гипоксией, представлена на рисунке 7.

При анализе толщины стенки легочной артерии (ЛА) установлено, что на фоне моделирования циркуляторной ЛГ с помощью гипоксии исследуемый показатель увеличивался более чем в 2 раза с $0,742 \pm 0,049$ до $1,728 \pm 0,24$ мкм. Введение КУД975 и L-норвалина приводило к статистически значимому (в сравнении с группой ЛАГ) уменьшению толщины стенки ЛА. Статистически значимым различий в эффективности снижения данного показателя между группами, получавшими КУД975 и L-норвалин, обнаружено не было. При оценке количества тромбированных сосудов в поле зрения обнаружено, что данный показатель в легких животных, получавших КУД975 и L-норвалин, был статистически значимо ниже, чем в группе животных с ЛГ без лечения (Рис. 7).

При оценке эффективности коррекции морфологических проявлений ЛГ в сердце показано, что КУД975 и L-норвалин в изученных дозах обладали выраженной фармакологической активностью, статистически значимо снижая площадь поперечного сечения кардиомиоцитов. Также уменьшение гипертрофии ПЖ было подтверждено гистологическим исследованием, продемонстрировавшим уменьшение вызванного гипоксией увеличения соотношения ПЖ/(ЛЖ+S) как при лечении КУД975, так и при лечении L-норвалином (Рис. 8). Соотношение площадей ЛЖ и ПЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день очевидно, что разработка новых ингибиторов аргиназ представляет собой многообещающую стратегию в отношении лечения заболеваний, связанных с нитрооксидэргической системой. Учитывая различную экспрессию аргиназы-1 и аргиназы-2 в тканях и их различное физиологическое действие, на сегодняшний день доступно достаточно большое количество специфических и селективных ингибиторов этих двух изоформ фермента. Например, эндотелиоциты экспрессируют обе изоформы аргиназ, однако точно неизвестно, какова роль каждой из этих изоформ в развитии эндотелиальной дисфункции (ЭД). Остаются значительные разногласия относительно роли экспрессии аргиназ при различных состояниях, таких как атеросклероз и другие формы воспаления сосудов. Например, гипергликемия при сахарном диабете вызывает ЭД посредством активации p38 митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), который вызывает повышенную регуляцию Arg1 в коронарных артериях и повышенную экспрессию Arg2 в брыжеечных артериях [17, 18].

Исследования показали, что блокада аргиназ может предотвращать снижение ангиогенеза за

счет увеличения экспрессии VEGF, индуцированной оксидом азота (NO), инициировать восстановление сосудов при экспериментальной ишемической ретинопатии (нормализация функции NOS и снижение выработки супероксида) [19], и способствовать заживлению ран у мышей, и предотвращать морфофункциональные изменения сердечно-сосудистой системы на фоне преэклампсии [20].

Таким образом, имеются существенные доказательства терапевтического потенциала ингибирования аргиназ в отношении эндотелий ассоциированной патологии, связанной с низкой биодоступностью NO. Следовательно, этот фермент очень привлекателен с точки зрения исследований и разработки новых соединений – кандидатов в лекарственные средства для лечения эндотелий-ассоциированной патологии. С другой стороны, нам известна эффективность разнонаправленного подхода к фармакологической коррекции ЭД, когда для терапевтического воздействия применяются два и более соединения, различных по своему механизму действия и точке приложения [21, 22].

Сочетание воздействия одного соединения на 2 различные мишени, представляющие из себя два разных звена патогенеза ЭД, видится перспективным для разработки новых кандидатов в лекарственные средства. В качестве второй мишени, которая, в дополнение к аргиназе-2, интересна для ингибирования при состояниях, сопровождающихся ЭД, выбран тромбин. Взаимодействие тромбоцитов со стенками сосудов играет важную роль при острых сердечно-сосудистых заболеваниях [23].

Тромбин является мощным активатором тромбоцитов, оказывая выраженное воздействие на эндотелий. Эндотелиальные клетки (ЭК) обладают антитромботической активностью, высвобождая NO и простациклин, которые являются мощными сосудорасширяющими средствами и ингибиторами активности тромбоцитов. Фермент свертывания крови тромбин, вырабатываемый на поверхности поврежденного эндотелия, индуцирует свертывание крови и оказывает множество функциональных воздействий на сам эндотелий. Тромбин воздействует на ЭК, стимулируя синтез и высвобождение различных агентов, таких как медиаторы воспаления, вазоактивные вещества и факторы роста. Он вызывает адгезию лейкоцитов к эндотелию, запуская экспрессию молекул адгезии на поверхности клеток, и вызывает нарушение проницаемости эндотелия. Известно, что действие тромбина на ЭК опосредуются его рецептором. На сегодняшний день показана различная реакция ЭК на тромбин. В целом эндотелиальные клетки капилляров, по-видимому, особенно чувствительны к этому ферменту. Вызванная тромбином ЭД, в микроциркуляторном русле может иметь патологические последствия и способствовать поражению органов-мишеней при эндотелий-ассоциированной патологии [24, 25].

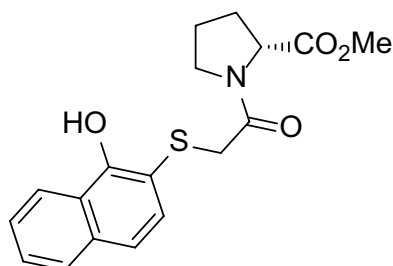


Рисунок 1 – Структурная формула исследуемого соединения с лабораторным шифром КУД975 – метиловый эфир 2-((1-гидроксиафталин-2-ил)тио)ацетил)-D-пролина

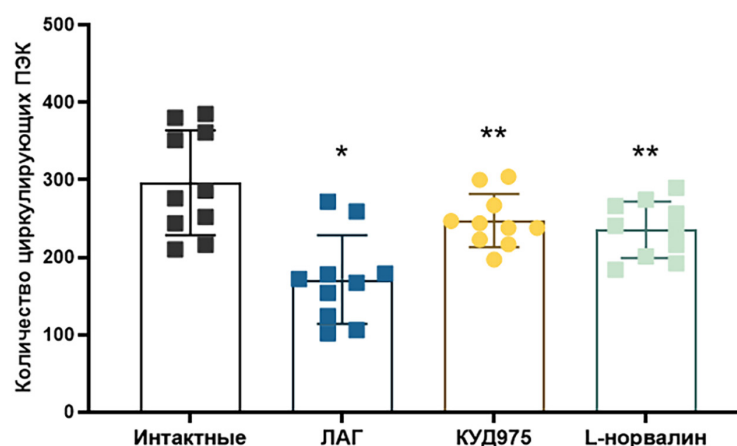


Рисунок 2 – Влияние исследуемых соединений на количество циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников (ПЭК) в крови животных в экспериментальных группах при легочной гипертензии на фоне гипоксии

Примечание (здесь и для Рис. 2–7): интактные – группа интактных животных; ЛАГ – легочная артериальная гипертензия, индуцированная гипоксией; КУД975 – введение соединения КУД975 в дозе 2 мг/кг на фоне моделирования ЛГ; L-норвалин – введение L-норвалина в дозе в дозе 20 мг/кг на фоне моделирования ЛГ; * – $p < 0,05$ по сравнению с интактными; ** – $p < 0,05$ по сравнению с ЛАГ.

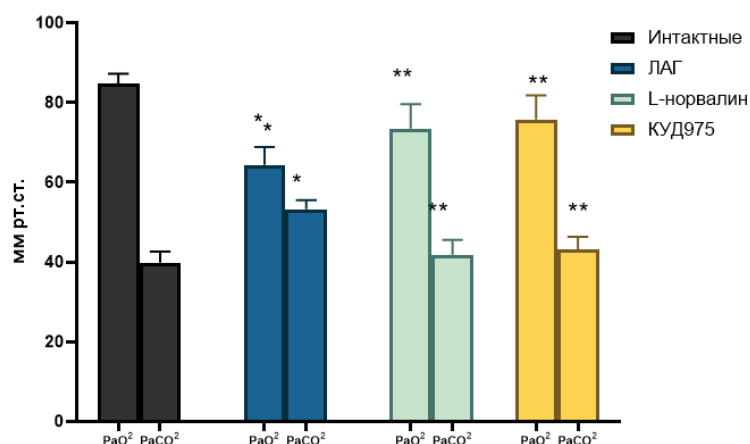


Рисунок 3 – Влияние КУД975 и L-норвалина на парциальное давление кислорода и углекислого газа в экспериментальных группах при легочной гипертензии на фоне гипоксии

Примечание: PaO₂ – парциальное давление кислорода; PaCO₂ – парциальное давление углекислого газа; * $p < 0,05$ по сравнению с интактными, ** – $p < 0,05$ по сравнению с ЛАГ.

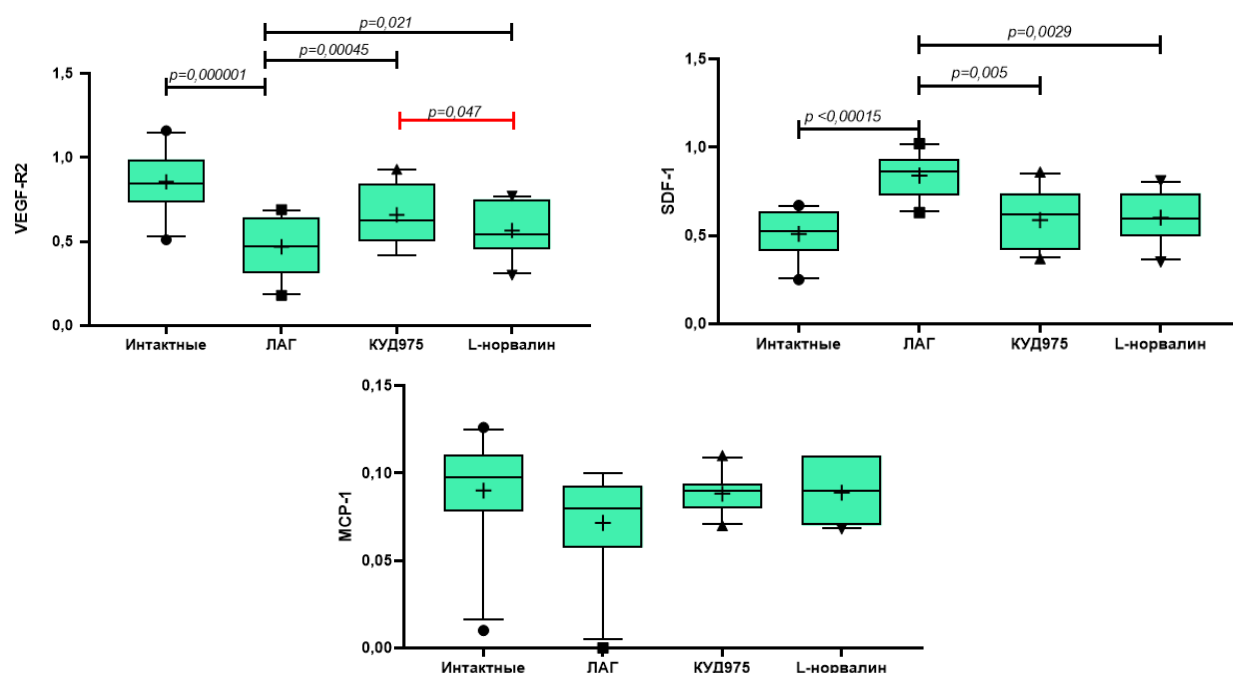


Рисунок 4 – Влияние КУД975 и Л-норвалина на экспрессию мРНК молекулярных мишеней развития легочной гипертензии на фоне гипоксии

Примечание: VEGF-R2 – рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2; SDF-1 – фактор стромальных клеток 1; MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1.

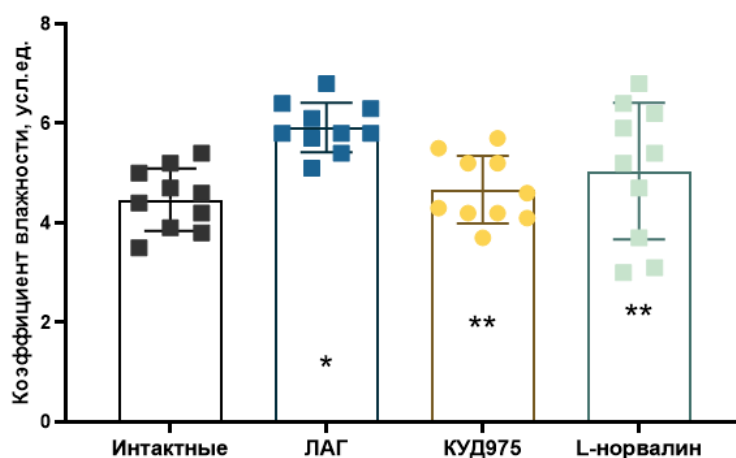


Рисунок 5 – Количественная оценка образования отека легких с помощью оценки соотношения массы влажных и сухих легких в группах животных, получавших КУД975 и Л-норвалина на фоне моделирования легочной гипертензии гипоксией

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с интактными; ** – $p < 0,05$ по сравнению с ЛАГ.

Таблица 1 – Показатели кардиогемодинамики в группах животных с моделированием легочной гипертензии и ее коррекцией с помощью исследуемых соединения

Показатели	Контроль	ЛАГ	ЛАГ+КУД975	ЛАГ+Л-норвалин
СДПЖ	28,8±4,84	51,8±19,23*	32,5±7,51**	33,1±4,9**
ДДПЖ	2,527±0,32	5,706±0,78*	3,918±0,5**	4,019±0,59**
dP/dt max	104,5±17,2	68,8±15,5*	88,4±10,9**	87,6±11,2**
dP/dt min	99,4±11,5	74,9±9,25*	86±7,53**	82,5±7,81**
ЧСС	365,6±19,4	336,8±24,37	344,2±31,6	350,7±26,5

Примечание: ЛАГ – группа животных с легочной гипертензией, индуцированной гипоксией; СДПЖ – систолическое давление в полости правого желудочка сердца; ДДПЖ – диастолическое давление в полости правого желудочка сердца; ЧСС – частота сердечных сокращений; dP/dt max – максимальная скорость нарастания внутрижелудочкового давления; dP/dt min – минимальная скорость нарастания внутрижелудочкового давления; * – $p < 0,05$ в сравнении с группой интактных животных; ** – $p < 0,05$ в сравнении с группой животных с экспериментальной легочной артериальной гипертензией без лечения (группа ЛАГ).

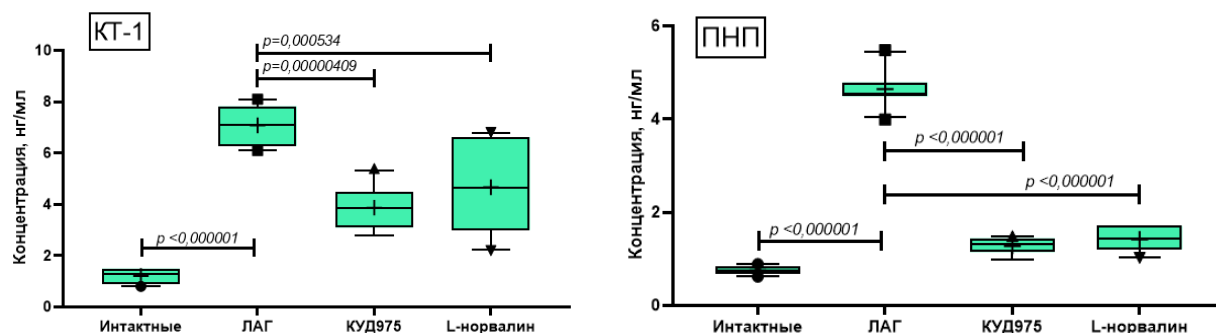


Рисунок 6 – Влияние КУД975 и Л-норвалина на концентрации в плазме крови цитокинов кардиотрофина-1 и предсердного натрийуретического пептида

Примечание: КТ-1 – кардиотрофин-1; ПНП – предсердный натрийуретический пептид.

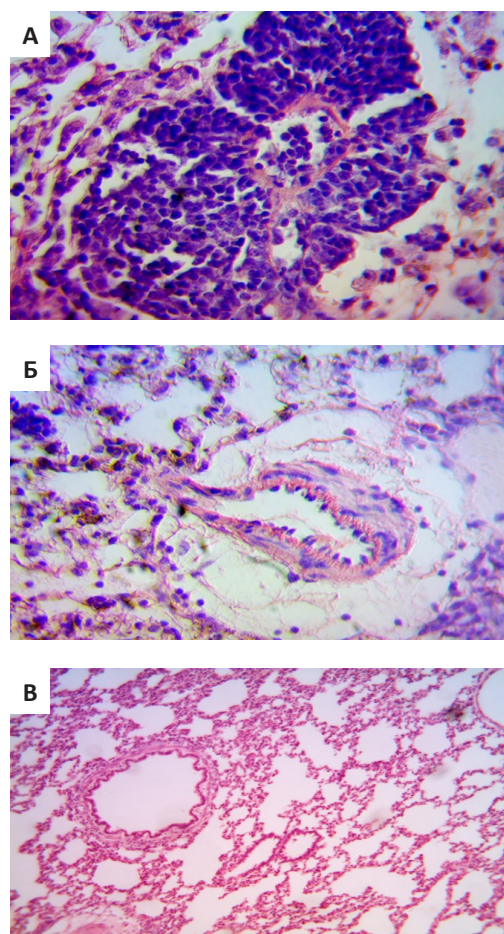
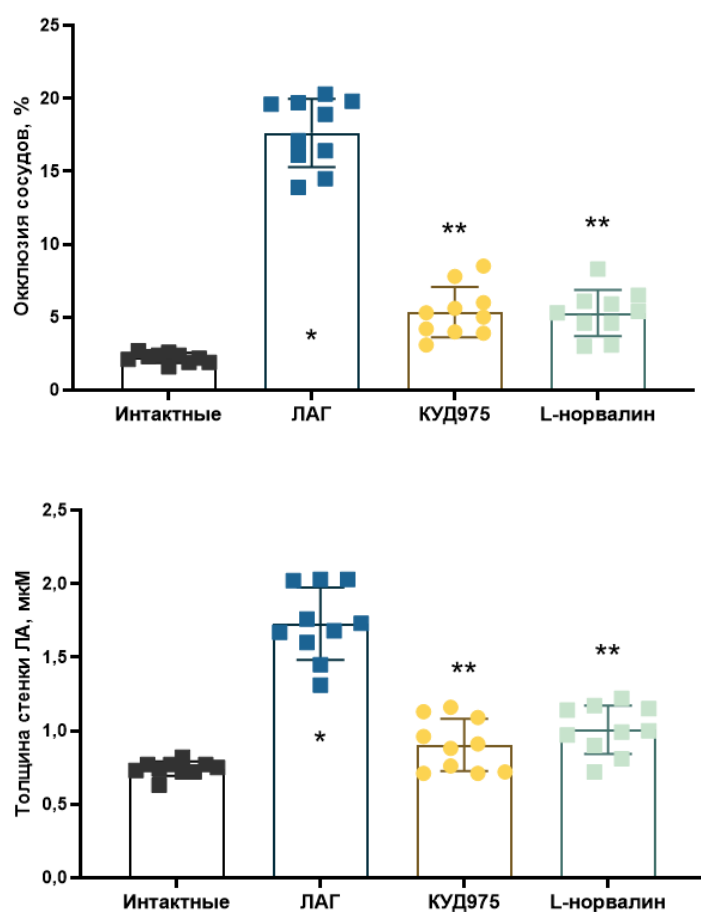


Рисунок 7 – Влияние КУД975 и Л-норвалина на гистологическое строение легких при моделировании циркуляторной легочной гипертензии гипоксией

Примечание: толщина стенки ЛА – толщина стенки легочной артерии; А – микрофотография стенки легочной артерии (×400); Б – микрофотография легкого, периваскулярный фиброз, окр. гематоксин+эозин (×400); * – при $p < 0,05$ по сравнению с интактными; ** – при $p < 0,05$ по сравнению с ЛАГ.

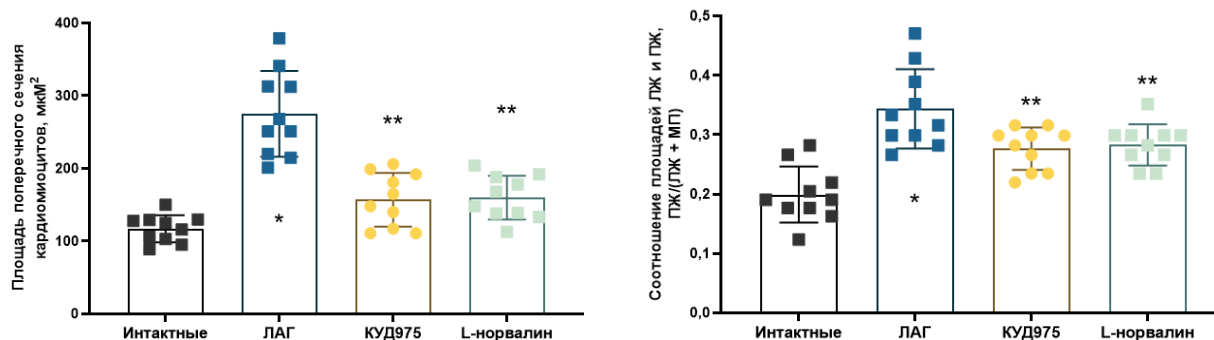


Рисунок 8 – Влияние КУД975 и L-норвалина на гистологическое строение правого желудочка сердца животных в экспериментальных группах

В рамках настоящего исследования для поиска соединений фенольной природы, обладающих эндотелиопротективным действием, использована концепция привилегированных структур. Для проведения виртуального поиска мишеней использовали несколько доступных на некоммерческой основе онлайн-сервисов. Физико-химические свойства исследуемых низкомолекулярных органических соединений были рассчитаны с использованием следующих вычислительных алгоритмов: OpenBabel; онлайн-сервис Molinspiration; онлайн-сервис «виртуальной лаборатории вычислительной химии» VCCL. Изучаемое в настоящем исследовании соединение фенольной природы с лабораторным шифром КУД975 является ингибитором аргиназы-2 и тромбина – участие этих ферментов в патогенезе нарушений функционирования сосудистого эндотелия на сегодняшний момент не вызывает сомнений. Ингибирование аргиназы-2, прежде всего, позволяет переключить звенья метаболического пути L-аргинин-eNOS-NO на эффективную генерацию NO и нормализацию эндотелийзависимых реакций в ответ на ацетилхолин и сосудистого гомеостаза в целом [26, 27]. В тоже время, ингибирование тромбина приводит к замедлению высвобождения тромбоцитами тромбоксана A2, вызывающего мощную вазоконстрикцию, которая предотвращается одновременным тромбин-индуцированным высвобождением простаглана и NO из ЭК. Следовательно, ингибирование выработки тромбина является эффективной терапевтической стратегией для коррекции индуцированной тромбином активации взаимодействия тромбоцитов со стенкой сосуда при ЭД [24].

Ранее было показано, что соединения фенольной природы предотвращают морфологические изменения в сердечно-сосудистой системе при моделировании преэклампсии [28]. В настоящем исследовании мы показали, что на модели циркуляторной ЛГ, вызванной гипоксией, введение исследуемого соединения-лидера с лабораторным шифром КУД975, как и препарата сравнения

L-норвалина, привело к статистически значимому снижению СДПЖ и скоростных показателей кардиогемодинамики. На фоне моделирования ЛГ мы изучили количество циркулирующих ПЭК в экспериментальных группах. Все больше и больше исследований демонстрируют, что циркулирующие ПЭК участвуют в сосудистом гомеостазе [29]. В настоящем исследовании показано снижение количества циркулирующих ПЭК более чем в 2 раза в группах животных с моделированием циркуляторной ЛГ и статистически значимое повышение количества ПЭК в группах животных, которым вводили исследуемые соединения, что свидетельствует о эндотелиопротективном действии КУД975.

Для изучения влияния исследуемых соединений на факторы, участвующие в доставке циркулирующих ПЭК к эндотелию пораженных сосудов, мы изучили экспрессию мРНК факторов, необходимых для доставки ПЭК к пораженным стенкам сосудов: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), а именно первый подтип его рецепторов (VEGF-R1) и фактор стромальных клеток-1 (SDF-1). Поскольку в патофизиологию ЛАГ вовлечены воспалительные процессы, мы также измерили уровни моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), основного маркера при воспалительных процессах на фоне ЛАГ [30]. Установлено, что уровни экспрессии мРНК VEGF-R2 в легких были статистически значимо снижены, а уровни SDF-1 наоборот статистически значимо повышены при ЛАГ. При применении соединений КУД975 и L-норвалина на модели ЛГ, индуцированной гипоксией, обнаружено статистически значимое повышение экспрессии мРНК VEGF-R2 и снижение экспрессии мРНК SDF-1. При этом степень увеличения экспрессии мРНК VEGF-R2 в группе животных, получавших КУД975, была статистически значимо выше таковой в группе животных, получавших L-норвалин.

Для дальнейшей оценки состояния сердечно-сосудистой системы на фоне моделирования ЛГ мы измерили содержание КТ-1 и ПНП в плазме крови. Первый цитокин ассоциирован с гипертрофией миокарда и сердечно-сосудистой патологией, авторой

является гормоном, выделяемым предсердиями в ответ на высокое АД – его действие заключается в уменьшении преднагрузки на сердце тем самым снижая АД [31]. Уменьшение концентраций КТ-1 и ПНП под влиянием исследуемых соединений свидетельствует о снижении проявлений сосудистого ремоделирования, вызванного ЛГ и согласуется с данными, полученными при гистологическом исследовании.

Развитие ЛАГ и ее коррекция исследуемыми соединениями подтверждена гистологическими исследованиями. Так, у животных с ЛА наблюдалось прогрессирующее ремоделирование легочных сосудов, включая значительное увеличение толщины стенки, показателей окклюзии и мускуляризации внутриацинарных сосудов, а также увеличение толщины стенки и соотношения стенки / просвет преацинарных легочных сосудов по сравнению с контролем. В сердце животных с ЛА обнаружена гипертрофия ПЖ, в том числе увеличение площади поперечного сечения кардиомиоцитов и

соотношения площадей ПЖ и ЛЖ сердца. Введение КУД975 и L-норвалина позволило добиться уменьшения признаков ремоделирования легочных сосудов путем уменьшения толщины стенки ЛА и степени окклюзии внутриацинарных легочных сосудов по сравнению с животными с ЛГ, индуцированной гипоксией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при изучении фармакологической активности показано, что соединение фенольной природы с лабораторным шифром КУД975 нормализует показатели гемодинамики, уменьшает признаки ремоделирования сердца и легочных сосудов и обладает выраженным эндотелиопротективным действием на модели ЛА, индуцированной гипоксией, и превосходит активность препарата сравнения L-норвалина по эффективности повышения количества циркулирующих ПЭК, увеличения экспрессии мРНК VEGF-R2 и снижения концентрации КТ-1.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРА

Автор подтверждает соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

Л.В. Корокина – разработка дизайна исследования, планирование и выполнение экспериментальной части исследования, оценка и интерпретация результатов, анализ литературы, подготовка графического материала, написание текста статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Bousseau S., Sobrano Fais R., Gu S., Frump A., Lahm T. Pathophysiology and new advances in pulmonary hypertension // *BMJ Med.* – 2023. – Vol. 2, No. 1. – Art. ID: e000137. DOI: 10.1136/bmjmed-2022-000137
2. Shah A.J., Beckmann T., Vorla M., Kalra D.K. New drugs and therapies in pulmonary arterial hypertension // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, No. 6. – Art. ID: 5850. DOI: 10.3390/ijms24065850
3. Humbert M., Kovacs G., Hoeper M.M., Badagliacca R., Berger R.M.F., Bida M., Carlsen J., Coats A.J.S., Escibano-Subias P., Ferrari P., Ferreira D.S., Ghofrani H.A., Giannakoulas G., Kiely D.G., Mayer E., Meszaros G., Nagavci B., Olsson K.M., Pepke-Zaba J., Quint J.K., Rådegran G., Simonneau G., Sitbon O., Tonia T., Toshner M., Vachiery J.L., Vonk Noordegraaf A., Delcroix M., Rosenkranz S.; ESC/ERS Scientific Document Group. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension // *Eur Heart J.* – 2022. – Vol. 43, No. 38. – P. 3618–3731. DOI: 10.1093/eurheartj/ehac237. Erratum in: *Eur Heart J.* – 2023. – Vol. 44, No. 15. – Art. ID: 1312.
4. Hoeper M.M., Mayer E., Simonneau G., Rubin L.J. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension // *Circulation.* – 2006. – Vol. 113, No. 16. – P. 2011–2020. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602565
5. Swisher J.W., Weaver E. The evolving management and treatment options for patients with pulmonary hypertension: current evidence and challenges // *Vasc Health Risk Manag.* – 2023. – Vol. 19. – P. 103–126. DOI: 10.2147/VHRM.S321025
6. Simonneau G., Montani D., Celermajer D.S., Denton C.P., Gatzoulis M.A., Krowka M., Williams P.G., Souza R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension // *Eur Respir J.* – 2019. – Vol. 53, No. 1. – Art. ID: 1801913. DOI: 10.1183/13993003.01913-2018
7. Zolty R. Novel experimental therapies for treatment of pulmonary arterial hypertension // *J Exp Pharmacol.* – 2021. – Vol. 13. – P. 817–857. DOI: 10.2147/JEP.S236743
8. Ball M.K., Waypa G.B., Mungai P.T., Nielsen J.M., Czech L., Dudley V.J., Beussink L., Dettman R.W., Berkelhamer S.K., Steinhorn R.H., Shah S.J., Schumacker P.T. Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 α // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2014. – Vol. 189, No. 3. – P. 314–324. DOI: 10.1164/rccm.201302-0302OC
9. Khemani E., McElhinney D.B., Rhein L., Andrade O., Lacro R.V., Thomas K.C., Mullen M.P. Pulmonary artery hypertension in formerly premature infants with bronchopulmonary dysplasia: clinical features and outcomes in the surfactant era // *Pediatrics.* – 2007. – Vol. 120, No. 6. – P. 1260–1269. DOI: 10.1542/peds.2007-0971
10. Kim G.B. Pulmonary hypertension in infants with bronchopulmonary dysplasia // *Korean J*

- Pediatr. – 2010. – Vol. 53, No. 6. – P. 688–693. DOI: 10.3345/kjp.2010.53.6.688
11. Samillan V., Haider T., Vogel J., Leuenberger C., Brock M., Schwarzwald C., Gassmann M., Ostergaard L. Combination of erythropoietin and sildenafil can effectively attenuate hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice // *Pulm Circ.* – 2013. – Vol. 3, No. 4. – P. 898–907. DOI: 10.1086/674758
 12. Gilinsky M.A., Polityko Y.K., Markel A.L., Latysheva T.V., Samson A.O., Polis B., Naumenko S.E. Norvaline reduces blood pressure and induces diuresis in rats with inherited stress-induced arterial hypertension // *Biomed Res Int.* – 2020. – Vol. 2020. – Art. ID: 4935386. DOI: 10.1155/2020/4935386
 13. Pokrovskiy M.V., Korokin M.V., Tsepeleva S.A., Pokrovskaya T.G., Gureev V.V., Kononova E.A., Gudyrev O.S., Kochkarov V.I., Korokina L.V., Dudina E.N., Babko A.V., Terehova E.G. Arginase inhibitor in the pharmacological correction of endothelial dysfunction // *Int J Hypertens.* – 2011. – Vol. 2011. – Art. ID: 515047. DOI: 10.4061/2011/515047
 14. Гудырев О.С., Файтельсон А.В., Соболев М.С., Покровский М.В., Покровская Т.Г., Корокин М.В., Поветка Е.Е., Миллер Э.С., Солдатов В.О. Изучение остеопротективного действия L-аргинина, L-норвалина и розувастатина на модели гипостероидиндуцированного остеопороза у крыс // *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.* – 2019. – Т. 27, № 3. – С. 325–332. DOI: 10.23888/PAVLOVJ2019273325-332
 15. Кудрявцев К.В., Корокин М.В., Якушев В.И. Изучение влияния соединений фенольной природы на процессы тромбообразования с использованием прижизненной микроскопии и флуоресцентных меток // *Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology.* – 2015. – Т. 1, № 4(6). – С. 4–8. DOI: 10.18413/2313-8971-2015-1-4-4-8
 16. YanYun P., Wang S., Yang J., Chen B., Sun Z., Ye L., Zhu J., Wang X. Interruption of CD40 pathway improves efficacy of transplanted endothelial progenitor cells in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension // *Cell Physiol Biochem.* – 2015. – Vol. 36, No. 2. – P. 683–696. DOI: 10.1159/000430130
 17. Caldwell R.B., Toque H.A., Narayanan S.P., Caldwell R.W. Arginase: an old enzyme with new tricks // *Trends Pharmacol Sci.* – 2015. – Vol. 36, No. 6. – P. 395–405. DOI: 10.1016/j.tips.2015.03.006
 18. Kossmann S., Schwenk M., Hausding M., Karbach S.H., Schmidgen M.I., Brandt M., Knorr M., Hu H., Kröller-Schön S., Schönfelder T., Grabbe S., Oelze M., Daiber A., Münzel T., Becker C., Wenzel P. Angiotensin II-induced vascular dysfunction depends on interferon- γ -driven immune cell recruitment and mutual activation of monocytes and NK-cells // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2013. – Vol. 33, No. 6. – P. 1313–1319. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301437. Erratum in: *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2013. – Vol. 33, No. 8. – Art. ID: e126.
 19. Wang L., Bhatta A., Toque H.A., Rojas M., Yao L., Xu Z., Patel C., Caldwell R.B., Caldwell R.W. Arginase inhibition enhances angiogenesis in endothelial cells exposed to hypoxia // *Microvasc Res.* – 2015. – Vol. 98. – P. 1–8. DOI: 10.1016/j.mvr.2014.11.002
 20. Kavalukas S.L., Uzgar A.R., Bivalacqua T.J., Barbul A. Arginase inhibition promotes wound healing in mice. *Surgery.* – 2012. – Vol. 151, No. 2. – P. 287–295. DOI: 10.1016/j.surg.2011.07.012
 21. Стаценко М.Е., Деревянченко М.В. Коррекция дисфункции эндотелия у больных артериальной гипертензией с сахарным диабетом 2-го типа на фоне комбинированной антигипертензивной терапии // *Терапевтический архив.* – 2014. – Т. 86, № 8. – С. 90–93.
 22. Shcheblykin D.V., Bolgov A.A., Pokrovskii M.V., Stepenko J.V., Tsuverskalova J.M., Shcheblykina O.V., Golubinskaya P.A., Korokina L.V. Endothelial dysfunction: developmental mechanisms and therapeutic strategies // *Research Results in Pharmacology.* – 2022. – Vol. 8, No. 4. – P. 115–139. DOI: 10.3897/rrpharmacology.8.80376
 23. Dehghani T., Panitch A. Endothelial cells, neutrophils and platelets: getting to the bottom of an inflammatory triangle // *Open Biol.* – 2020. – Vol. 10, No. 10. – Art. ID: 200161. DOI: 10.1098/rsob.200161
 24. De Pablo-Moreno J.A., Serrano L.J., Revuelta L., Sánchez M.J., Liras A. The vascular endothelium and coagulation: homeostasis, disease, and treatment, with a focus on the von willebrand factor and factors VIII and V // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, No. 15. – Art. ID: 8283. DOI: 10.3390/ijms23158283
 25. Rabet M.J., Plantier J.L., Dejana E. Thrombin-induced endothelial cell dysfunction // *Br Med Bull.* – 1994. – Vol. 50, No. 4. – P. 936–945. DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072935
 26. Lundberg J.O., Weitzberg E. Nitric oxide signaling in health and disease // *Cell.* – 2022. – Vol. 185, No. 16. – P. 2853–2878. DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.010
 27. Mahdi A., Kövamees O., Pernow J. Improvement in endothelial function in cardiovascular disease – Is arginase the target? // *Int J Cardiol.* – 2020. – Vol. 301. – P. 207–214. DOI: 10.1016/j.ijcard.2019.11.004
 28. Lokteva T.I., Rozhkov I.S., Gureev V.V., Gureeva A.V., Zatolokina M.A., Avdeeva E.V., Zhilinkova L.A., Prohoda E.E., Yarcova E.O. Correction of morphofunctional disorders of the cardiovascular system with asialized erythropoietin and arginase II selective inhibitors KUD 974 and KUD 259 in experimental preeclampsia // *Research Results in Pharmacology.* – 2020. – Vol. 6, No. 1. – P. 29–40. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.50851
 29. Naito H., Iba T., Takakura N. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells // *Int Immunol.* – 2020. – Vol. 32, No. 5. – P. 295–305. DOI: 10.1093/intimm/xxaa008
 30. Peng B., Kong G., Yang C., Ming Y. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation // *Cell Death Dis.* – 2020. – Vol. 11, No. 2. – Art. ID: 79. DOI: 10.1038/s41419-020-2276-8
 31. Guo H.J., Jiang F., Chen C., Shi J.Y., Zhao Y.W. Plasma brain natriuretic peptide, platelet parameters, and cardiopulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease // *World J Clin Cases.* – 2021. – Vol. 9, No. 36. – P. 11165–11172. DOI: 10.12998/wjcc.v9.i36.11165

АВТОР

Корокина Лилия Викторовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский

государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-4115-1564. E-mail: Korokina@mail.ru

УДК 615.03:615.72



Сравнительный анализ физико-химических свойств, биоэквивалентности, безопасности и переносимости отечественного семаглутида

А.С. Аметов¹, И.Е. Шохин², Е.А. Рогожина³, Т.Г. Бодрова⁴, М.Е. Невретдинова⁵, П.А. Белый⁴, К.Я. Заславская⁶, В.С. Щербакова⁷, Д.В. Куркин⁴, К.Н. Корянова⁸, Е.С. Мищенко⁸, Э.Ю. Кесова⁹, Е.Д. Козлов⁶, Е.С. Самошкина⁶, Д.Н. Андреев¹⁰, Ю.Г. Казаишвили⁷, С.М. Носков^{11,12}, Л.А. Балыкова⁶

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125993, Россия, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

² Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет», 119454, Россия, г. Москва, пр-кт Вернадского, д. 78

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127006, Россия, г. Москва, ул. Долгоруковская, д. 4

⁵ Общество с ограниченной ответственностью «Практика здоровья», 117624, Россия, г. Москва, ул. Скобелевская, д. 1

⁶ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва», 430005, Россия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68

⁷ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России», 170100, Россия, г. Тверь, ул. Советская, д. 4

⁸ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532, Россия, г. Пятигорск, пр-кт Калинина, д. 11

⁹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

¹⁰ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127994, Россия, ГСП-4, г. Москва, Рахмановский пер, д. 3.

¹¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

¹² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница № 3», 150007, Россия, г. Ярославль, ул. Маяковского, д. 61

E-mail: kiryonok@yandex.ru

Получена 25.10.2023

После рецензирования 23.11.2023

Принята к печати 30.11.2023

Для цитирования: А.С. Аметов, И.Е. Шохин, Е.А. Рогожина, Т.Г. Бодрова, М.Е. Невретдинова, П.А. Белый, К.Я. Заславская, В.С. Щербакова, Д.В. Куркин, К.Н. Корянова, Е.С. Мищенко, Э.Ю. Кесова, Е.Д. Козлов, Е.С. Самошкина, Д.Н. Андреев, Ю.Г. Казаишвили, С.М. Носков, Л.А. Балыкова. Сравнительный анализ физико-химических свойств, биоэквивалентности, безопасности и переносимости отечественного семаглутида. *Фармация и фармакология*. 2023;11(4):324-346. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-324-346

© А.С. Аметов, И.Е. Шохин, Е.А. Рогожина, Т.Г. Бодрова, М.Е. Невретдинова, П.А. Белый, К.Я. Заславская, В.С. Щербакова, Д.В. Куркин, К.Н. Корянова, Е.С. Мищенко, Э.Ю. Кесова, Е.Д. Козлов, Е.С. Самошкина, Д.Н. Андреев, Ю.Г. Казаишвили, С.М. Носков, Л.А. Балыкова, 2023

For citation: A.S. Ametov, I.E. Shokhin, E.A. Rogozhina, T.G. Bodrova, M.E. Nevretdinova, P.A. Bely, K.Ya. Zaslavskaya, V.S. Scherbakova, D.V. Kurkin, K.N. Koryanova, E.S. Mishchenko, E.Yu. Kesova, E.D. Kozlov, E.S. Samoshkina, D.N. Andreev, Yu.G. Kazaishvili, S.M. Noskov, L.A. Balykova. Comparative analysis of physicochemical properties, bioequivalence, safety and tolerability of the first domestic semaglutide. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(4):324-346. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-324-346

Семаглутид является представителем аналогов инкретинового гормона человеческого глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и в настоящее время в России используется для лечения сахарного диабета 2 типа (СД 2; в монотерапии и в комбинированной терапии), в том числе у пациентов с ожирением и избыточной массой тела.

Цель. Провести сравнительную оценку физико-химических свойств, биологической активности, биоэквивалентности и безопасности, включая переносимость и иммуногенность, лекарственного препарата Квинсента® (семаглутид, 1,34 мг/мл, раствор для подкожного введения, ООО «Промомед», Россия) и препарата Оземпик® (семаглутид, 1,34 мг/мл, раствор для подкожного введения, Ново Нордиск А/С, Дания), при введении здоровым добровольцам.

Материалы и методы. Для оценки степени подобия исследуемого препарата Квинсента® (семаглутид, 1,34 мг/мл, раствор для подкожного введения, ООО «Промомед», Россия) с химически синтезированным активным веществом оригинальному (референтному) препарату Оземпик® (семаглутид, 1,34 мг/мл, раствор для подкожного введения, Ново Нордиск А/С, Дания) было проведено сравнительное изучение физико-химических свойств и биологической активности. Для оценки биоэквивалентности исследуемого и референтного препарата было проведено открытое рандомизированное параллельное сравнительное исследование с участием здоровых добровольцев ($n=54$), из них в популяцию для оценки биоэквивалентности вошли 54 участника. Добровольцы были рандомизированы в 2 группы в соотношении 1:1 и получали однократно подкожно утром натощак, либо исследуемый препарат (отечественный семаглутид в дозе 0,5 мг), либо референтный препарат (зарубежный семаглутид в дозе 0,5 мг). Концентрацию семаглутида определяли в образцах сыворотки крови с помощью предварительно валидированного метода иммуноферментного анализа (ИФА). Количественное определение антител к семаглутиду в сыворотке крови человека методом ИФА было проведено с помощью фотометра для микропланшетов с использованием готовых предварительно валидированных производителем наборов. Вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов делали с использованием подхода, основанного на оценке 90% доверительных интервалов для отношений средних геометрических значений параметров C_{max} , $AUC_{(0-t)}$ семаглутида в исходных единицах измерения.

Результаты. Результаты сравнительного анализа исследуемого и референтного препарата демонстрируют сопоставимость физико-химических свойств и биологической активности. Результаты клинического исследования продемонстрировали биоэквивалентность исследуемого препарата и препарата сравнения. Так, фармакокинетические параметры препаратов были сопоставимы между собой: величина C_{max} для исследуемого препарата составила $42,088 \pm 8,827$ нг/мл, для препарата сравнения Оземпик® данный показатель составил $42,2556 \pm 7,84$. При этом период полувыведения для исследуемого препарата и препарата сравнения составил $168,39 \pm 39,47$ и $157,99 \pm 28,57$ ч, соответственно. Полученные 90%-ные доверительные интервалы для отношения значений C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ исследуемого препарата и референтного препарата составили 90,89–109,15 и 91,66–111,27%, соответственно. Переносимость препаратов у добровольцев была отмечена как хорошая. При проведении исследования не было зафиксировано нежелательных явлений. В течение всего исследования не было зарегистрировано ни одного серьезного нежелательного явления. По результатам анализа иммуногенности у добровольцев не были выявлены антитела к семаглутиду российского производства в сыворотке крови, что свидетельствовало об отсутствии иммуногенности препарата.

Заключение. В ходе проведенного исследования была подтверждена сопоставимость физико-химических свойств и биологической активности исследуемого российского препарата с химически синтезированным активным веществом Квинсента® препарату сравнения Оземпик®: диапазон активности исследуемых препаратов находился в пределах 80–120% по отношению к стандартному образцу семаглутида. Показана биоэквивалентность и сходный профиль безопасности, включая иммуногенность и переносимость российского препарата Квинсента® (семаглутид 1,34 мг/мл, ООО «Промомед», Россия) в сравнении с зарубежным препаратом Оземпик® (семаглутид 1,34 мг/мл, Ново Нордиск А/С, Дания).

Ключевые слова: глюкагоноподобный пептид-1; ГПП-1; биоэквивалентность; фармакокинетика; семаглутид; сахарный диабет 2-го типа, физико-химические свойства, профиль безопасности, биологическая активность

Список сокращений: СД 2 – сахарный диабет 2 типа; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ГК – гликемический контроль; АССЗ – атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания; HbA1c – гликированный гемоглобин; ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид-1; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; инГЛТ-2 – ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера-2; ХБП – хроническая болезнь почек; ИМТ – индекс массы тела; ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция; АД – артериальное давление; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЧДД – частота дыхательных движений; ЭКГ – электрокардиография; НЯ – нежелательное явление; СНЯ – серьезное нежелательное явление; ДИ – доверительный интервал.

Comparative analysis of physicochemical properties, bioequivalence, safety and tolerability of the first domestic semaglutide

A.S. Ametov¹, I.E. Shokhin², E.A. Rogozhina³, T.G. Bodrova⁴, M.E. Nevretdinova⁵, P.A. Bely⁴, K.Ya. Zaslavskaya⁶, V.S. Scherbakova⁷, D.V. Kurkin⁴, K.N. Koryanova⁸, E.S. Mishchenko⁸, E.Yu. Kesova⁹, E.D. Kozlov⁶, E.S. Samoshkina⁶, D.N. Andreev¹⁰, Yu.G. Kazaishvili⁷, S.M. Noskov^{11,12}, L.A. Balykova⁶

¹ Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Bld. 1, 2/1, Barrikadnaya Str., Moscow, Russia, 125993

² Limited Liability Company "Center for Pharmaceutical Analytics", 8, Simferopolsky Blvd, Moscow, Russia, 117638

³ MIREA – Russian Technological University, 78, Vernadsky Ave., Moscow, Russia, 119454

⁴ Yevdokimov Moscow State Medical and Dental University, 4, Dolgorukovskaya Str., Moscow, Russia, 127006

⁵ Limited Liability Company "Health Practice", 1, Skobelevskaya Str., Moscow, Russia, 117624

⁶ National Research Ogarev Mordovia State University, 68, Bolshevistskaya Str., Saransk, Russia, 430005

⁷ Tver State Medical University, 4, Sovetskaya Str., Tver, Russia, 170100

⁸ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

⁹ Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Bldg. 2, 8, Trubetskaya Str., Moscow, Russia, 119991

¹⁰ Russian University of Medicine, 3, Rakhmanovsky Ln., Moscow, GSP-4, Russia, 127994

¹¹ Yaroslavl State Medical University, 5, Revolutionary Str., Yaroslavl, Russia, 150000

¹² Clinical Hospital No. 3, 61, Mayakovskogo Str., Yaroslavl, Russia, 150007

E-mail: kiryonok@yandex.ru

Received 25 Oct 2023

After peer review 23 Nov 2023

Accepted 30 Nov 2023

Semaglutide is a representative of analogues of the incretin hormone human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and is currently used in Russia for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM; in monotherapy and in combination therapy), including patients with obesity and overweight.

The aim of the work was to conduct a comparative assessment of the physicochemical properties, a biological activity, bioequivalence and safety, including tolerability and immunogenicity, of the drug Quincent® (semaglutide, 1.34 mg/ml, a solution for a subcutaneous administration, Promomed Rus LLC, Russia) and the drug Ozempic® (semaglutide, 1.34 mg/ml, a solution for a subcutaneous administration, Novo Nordisk A/S, Denmark) when administered to healthy volunteers.

Materials and methods. To assess the degree of similarity of the study drug Quincenta® (semaglutide, 1.34 mg/ml, a solution for a subcutaneous administration, Promomed Rus LLC, Russia) with a chemically synthesized active substance to the original (reference) drug Ozempic® (semaglutide, 1.34 mg/ml, a solution for a subcutaneous administration, Novo Nordisk A/S, Denmark), a comparative study of physicochemical properties and a biological activity was carried out. To assess the bioequivalence of the study drug and the reference drug, an open randomized parallel comparative study with the participation of healthy volunteers ($n=54$), 54 participants of which had been included in the population, was conducted. The volunteers were randomized into 2 groups in a 1:1 ratio, and received a single dose subcutaneously either of the study drug (domestic semaglutide at a dose of 0.5 mg) or the reference drug (foreign semaglutide at a dose of 0.5 mg). The mode of administration was in the morning on an empty stomach. A semaglutide concentration was determined in serum samples using a previously validated enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. A quantitative determination of antibodies to semaglutide in the human serum by ELISA was carried out with a microplate photometer using ready-made kits pre-validated by the manufacturer. The conclusion about the bioequivalence of the compared drugs was made using an approach based on the assessment of 90% confidence intervals for the ratios of the geometric mean values of the parameters C_{max} , $AUC_{(0-t)}$ of semaglutide in the measurement original units.

Results. The results of the comparative analysis of the study drug and the reference drug demonstrate the comparability of their physicochemical properties and biological activity. The results of the clinical study demonstrated the bioequivalence of the test drug and the reference drug. Thus, the pharmacokinetic parameters of the drugs were comparable to each other: the $C_{\max}$ value for the study drug was 42.088 ± 8.827 ng/ml, for the reference drug Ozempic® it was 42.2556 ± 7.84 . Herewith, the half-life for the study drug and the reference drug was 168.39 ± 39.47 and 157.99 ± 28.57 hours, respectively. The resulting 90% confidence intervals for the ratio of the $C_{\max}$ and AUC_{0-t} values of the study drug and the reference drug were 90.89–109.15 and 91.66–111.27%, respectively. The tolerability of the drugs in the volunteers was notified as good. No adverse events were recorded during the study. No serious adverse events were reported throughout the study. According to the results of the immunogenicity analysis, no antibodies to Russian-made semaglutide were detected in the blood serum of the volunteers, which indicated the lack of Results. The results of a comparative analysis of the study drug and the reference drug demonstrate the comparability of physicochemical properties and biological activity. The results of the clinical study demonstrated the bioequivalence of the study drug and the reference drug. Thus, the pharmacokinetic parameters of the drugs were comparable to each other: the $C_{\max}$ value for the study drug was 42.088 ± 8.827 ng/ml, for the reference drug Ozempic® this figure was 42.2556 ± 7.84 . At the same time, the half-life for the study drug and the reference drug was 168.39 ± 39.47 and 157.99 ± 28.57 hours, respectively. The resulting 90% confidence intervals for the ratio of the $C_{\max}$ and AUC_{0-t} values of the study drug and the reference drug were 90.89–109.15 and 91.66–111.27%, respectively. Tolerability of the drugs in volunteers was noted as good. No adverse events were recorded during the study. No serious adverse events were reported throughout the study. According to the results of the immunogenicity analysis, no antibodies to Russian-made semaglutide were detected in the blood serum of the volunteers, which indicated the lack of the drug immunogenicity.

Conclusion. In the course of the study, the comparability of the physicochemical properties and biological activity of the studied Russian drug with the chemically synthesized active substance Quincenta® to the reference drug Ozempic® was confirmed: the activity range of the studied drugs was within 80–120% in relation to the standard sample of semaglutide. The bioequivalence and a similar safety profile, including the immunogenicity and tolerability of the Russian drug Quincenta® (semaglutide 1.34 mg/ml, Promomed Rus LLC, Russia) were shown in comparison with the foreign drug Ozempic® (semaglutide 1.34 mg/ml, Novo Nordisk A/C, Denmark).

Keywords: glucagon-like peptide-1; GLP-1; bioequivalence; pharmacokinetics; semaglutide; type 2 diabetes mellitus; physicochemical properties; safety profile; biological activity

Abbreviations: T2DM – Type 2 diabetes mellitus; CVDs – cardiovascular diseases; GK – glycemic control; ASCVDs – atherosclerotic cardiovascular diseases; HbA1c – glycated hemoglobin; GLP-1 – glucagon-like peptide-1; CHF – chronic heart failure; iNGLT-2 – inhibitors of sodium-glucose cotransporter-2; CKD – chronic kidney disease; BMI – body mass index; ARVI – acute respiratory viral infection; AP – arterial pressure; HR – heart rate; RR – respiratory rate; ECG – electrocardiography; AE – adverse event; SAE – serious adverse event; CI – confidence interval.

ВВЕДЕНИЕ

Учитывая рост распространенности сахарного диабета 2 типа (СД 2), а также связанных с ним осложнений¹ [1], потребность в разработке высокоэффективных стратегий терапии этого тяжелого заболевания никогда не была столь высокой. В центре внимания лечения СД 2 традиционно был контроль гликемии², но в последние годы в стандартах лечения подчеркивается важность многофакторного подхода, который включает коррекцию факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), например, гипергликемии, а также избыточного веса / ожирения, гипертонии и дислипидемии³ [1, 2].

Известно, что у людей с СД 2 риск развития ССЗ в 2–4 раза выше, чем у людей без диабета, а сердечно-сосудистые события чаще возникают в более раннем возрасте. Именно ССЗ являются основной причиной смерти пациентов с СД 2⁴ [3, 4]. Доказано, что воздействие на сердечно-сосудистые факторы риска

в рамках лечения СД 2 позволяет снизить смертность от самого заболевания и его осложнений. Так, исследование Steno-2 [5] показало, что комплексный контроль факторов риска при СД может снизить частоту сердечно-сосудистых событий более чем на 50%.

Но хотя более жесткий гликемический контроль (ГК) показал свою эффективность в отношении микрососудистых осложнений [6] и недавние обсервационные исследования [7, 8] продемонстрировали, что повышение уровня HbA1c ассоциировано с большим риском сердечно-сосудистых событий, точную роль ГК в снижении риска ССЗ еще предстоит выяснить [9].

В лечении пациентов с СД 2 необходима персонализация выбора сахароснижающей терапии с учётом индивидуальных характеристик пациента (особенно указания на высокий риск атеросклеротических ССЗ (АССЗ) или уже имеющихся АССЗ, хроническую сердечную недостаточность (ХСН), хроническую болезнь почек (ХБП), ожирение, высокий риск гипогликемии) и доминирующей клинической проблемы⁵. Таким образом, у пациентов с СД 2 и с уже имеющимися ССЗ следует отдавать предпочтение сахароснижающим

¹ International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas (2021). – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.idf.org/diabetesatlas/data/en/region/3/eur.html>

² Клинические рекомендации «Сахарный диабет 2 типа у взрослых», 2022. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/290_2

³ Там же.

⁴ International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 2021.

⁵ Там же.

препаратам⁶ с доказанной сердечно-сосудистой безопасностью⁷ [1, 2, 4, 10].

Ключевым звеном, регулирующим выработку инсулина в организме, является глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1). Агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (арГПП-1) оказывают действие подобно инкретиновому гормону ГПП-1 и опосредуют свои эффекты через его рецепторы, которые экспрессируются в поджелудочной железе, желудочно-кишечном тракте, сердце, легких, почках и мозге. Было показано, что рецепторы ГПП-1 в поджелудочной железе и головном мозге ответственны за соответствующие улучшения ГК и снижение массы тела. Функциональные эффекты в поджелудочной железе включают глюкозозависимое высвобождение инсулина, а также повышение регуляции его биосинтеза, а также глюкокиназы и транспортеров глюкозы. Воздействие на ГПП-1 рецепторы также вызывает глюкозозависимое снижение секреции глюкагона, что, в свою очередь, уменьшает печеночный выброс глюкозы. В поджелудочной железе рецепторы ГПП-1 преимущественно локализованы на бета-клетках, продуцирующих инсулин, с заметно более слабой экспрессией на ацинарных клетках экзокринной поджелудочной железы. Большая часть ГПП-1 вырабатывается в желудочно-кишечном тракте. В головном мозге ГПП-1 продуцируется в нейронах, вероятно, представляет собой нейропептид с физиологически и фармакологически значимыми эффектами на потребление пищи и массу тела, потенциальной нейромодулирующей ролью и возможными эффектами при ряде других невропатологических состояний, включая нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера, Паркинсона), травмы мозга и инсульты, а также при депрессии, тревоге и зависимости [11].

Главным достоинством для препаратов ряда арГПП-1, в том числе, для семаглутида, является способность снижать общую смертность и риск развития больших сердечно-сосудистых событий (Major Adverse Cardiovascular Event, MACE), таких как нефатальный инфаркт, нефатальный инсульт или смерть от ССЗ и улучшать почечные исходы у пациентов с СД 2 [12].

Первым таким препаратом из класса арГПП-1 стал эксенатид, который был одобрен к применению Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами (U.S. Food and Drug Administration, FDA). С 2005 года он успешно применяется в клинической практике в США, странах Европы, а с 2007 года и в России. В настоящее время шесть препаратов арГПП-1, каждый из которых отличается уникальной стратегией доставки лекарственных средств, одобрены FDA и еще несколько новых препаратов находятся на стадии

разработки. Учитывая быструю элиминацию, как основную проблему для клинического применения арГПП-1, исследователями были успешно разработаны и внедрены различные стратегии увеличения периода полувыведения данных препаратов, включая последовательную модификацию и увеличение длительности их действия [13]. Тем не менее, в целом для арГПП-1 характерна способность к снижению уровня HbA1c на 1–1,5%, а также положительный эффект в отношении индекса массы тела (ИМТ), артериального давления (АД) и липидного профиля [14], являющихся основными факторами риска ССЗ.

Семаглутид является одним из последних одобренных как в России⁸, так во многих зарубежных странах, лекарственным препаратом из группы арГПП-1. Данный препарат семаглутида был разработан в результате проведения большого пласта исследований, базирующихся на основе разработки лираглутида [15].

Молекула семаглутида имеет 94% гомологию с человеческим ГПП-1 и 3 основные структурные модификации по сравнению с человеческим ГПП-1: 1) замещение аминокислоты в положении C₈ (аланина на α-аминоизомасляную кислоту), что препятствует разрушению пептида ферментом дипептидилпептидазой-4 (ДПП-4); 2) ацилирование лизина в основной части пептида и прикреплении C₁₈-жирной кислоты в положении C₂₆ с целью обеспечения сильного и специфического связывания с альбумином; 3) замещение аминокислоты в положении C₃₄ (лизина на аргинин) – это препятствует присоединению C₁₈-двухосновной жирной кислоты на неверном участке молекулы семаглутида [16].

В доклинических и фармакокинетических исследованиях с участием взрослых пациентов с СД2 было показано, что по сравнению с лираглутидом, который вводится 1 р/сут, семаглутид имеет еще более длительный период полувыведения (от 7 дней), что позволяет применять его 1 раз в неделю [16–19]. Эффект семаглутида не изменялся у пациентов с нарушением функции почек или печени, за исключением терминальной почечной и печеночной недостаточности [20, 21]. Выведение семаглутида происходит главным образом с мочой (примерно 3% в неизмененном виде), а также с калом [22].

Семаглутид в дозах 0,5 и 1,0 мг был одобрен для применения при СД 2-го типа в США в 2017 году⁹, Европейским агентством по лекарственным средствам – в 2018 году¹⁰.

⁸ Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. Квинсента®. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=bf3309b5-3cd1-491a-bef6-ac1db65daa4c

⁹ US Food and Drug Administration. OZEMPIC (semaglutide) injection prescribing information. 2017. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/2096371bl.pdf

¹⁰ Novo Nordisk Company Announcement. Ozempic® (semaglutide) approved in the EU for the treatment of type 2 diabetes. February 2, 2018. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.novonordisk.com/bin/getPDF.2167679.pdf>

⁶ Там же.

⁷ Там же.

Семаглутид зарегистрирован в Российской Федерации и в настоящее время входит в клинические рекомендации Минздрава РФ¹¹ по лечению пациентов с СД 2, а также в Алгоритмы специализированной помощи больным СД [2]. Согласно данным документам семаглутид рекомендован для применения пациентам с СД с указанием на высокий риск АССЗ, а также с уже установленным диагнозом АССЗ в качестве приоритетной терапии, а также пациентам с ХБП 1–4 стадии для нефропротекции при наличии противопоказаний или непереносимости ингибиторов натрий-глюкозного котранспортера-2 (иНГЛТ-2) при наличии сопутствующего диагноза «ожирение», что определяет его востребованность для российских пациентов. Вместе с тем, на российском фармацевтическом рынке семаглутид был представлен только в виде зарубежного препарата, который в настоящее время недоступен. В связи с этим представляется актуальной разработка и локализация производства полного цикла от субстанции до готовой лекарственной формы и последующее изучение биоэквивалентности отечественного аналога семаглутида для обеспечения лекарственной независимости страны и увеличения доступа наших сограждан к современному препарату высокого качества.

Согласно руководству FDA¹², альфа-аминокислотные полимеры, такие как глюкагон, семаглутид и др., имеющие в своем составе до 40 аминокислотных остатков, считаются не белковыми молекулами, а пептидами. По мнению FDA, для подтверждения эквивалентности синтетического пептида и семаглутида, полученного биотехнологическим путем, содержащегося в препарате-предшественнике, достаточно доказать структурную идентичность активной фармацевтической субстанции (АФС), используя современные аналитические методы.

Компания ООО «Промомед Рус» в рамках реализации стратегии по обеспечения лекарственной независимости в нашей стране разработала собственную технологию получения АФС с использованием методов химического синтеза и выделения семаглутида в готовую лекарственную форму для лечения СД 2. Лекарственный препарат «Квинсента» (раствор для подкожного введения, 0,25/0,5 мг/доза, 1 мг/доза) прошел весь цикл необходимых исследований и зарегистрирован на территории РФ (ЛП-008828 от 17.10.2023). Полный цикл производства от субстанции до

готовой лекарственной формы на территории РФ позволяет, с одной стороны, обеспечить максимальный контроль за качеством продукта, а с другой – гарантировать бесперебойное обеспечение населения жизненно-важным лекарственным препаратом.

Для дополнительной оценки качества и безопасности разработанных лекарственных препаратов, их регистрации в Российской Федерации в соответствии с российскими регуляторными требованиями помимо физико-химических методов анализа и доклинических исследований, необходимо провести исследование фармакокинетики, безопасности и иммуногенности лекарственного препарата Квинсента® (семаглутид 1,34 мг/мл, ООО «Промомед», Россия) в сравнении с зарубежным препаратом-предшественником Оземпик® (семаглутид 1,34 мг/мл, Ново Нордиск А/С, Дания).

ЦЕЛЬ. Оценить физико-химические свойства, биологическую активность, биоэквивалентность и сопоставимость профиля безопасности и переносимости лекарственного препарата Квинсента® (семаглутид 1,34 мг/мл, ООО «Промомед», Россия) и лекарственного препарата Оземпик® (семаглутид 1,34 мг/мл, Ново Нордиск А/С, Дания) при применении здоровыми добровольцами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Физико-химические свойства и биологическая активность

С целью оценки степени сопоставимости (подобия) исследуемого препарата с химически синтезированным активным веществом Квинсента® (семаглутид 1,34 мг/мл, ООО «Промомед», Россия) оригинальному (референтному) препарату Оземпик® (семаглутид 1,34 мг/мл, Ново Нордиск А/С, Дания) было проведено сравнительное изучение физико-химических свойств и биологической активности. В целях формирования репрезентативного профиля качества и получения достоверных данных по сопоставимости согласно Решению № 89 («Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза») в исследовании использовали три серии (образца) оригинального (референтного) лекарственного препарата и три серии (образца) синтетического аналога (исследуемого препарата).

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой области (200–400 нм)

Получение спектров поглощения в ультрафиолетовой области для отечественного и зарубежного препаратов проводили с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония) в спектральном

¹¹ Клинические рекомендации «Сахарный диабет 2 типа у взрослых», 2022.

¹² U.S. Food and Drug Administration. ANDAs for Certain Highly Purified Synthetic Peptide Drug Products That Refer to Listed Drugs of rDNA Origin Guidance for Industry, 2021 – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/andas-certain-highly-purified-synthetic-peptide-drug-products-refer-listed-drugs-rdna-origin>

диапазоне волн 190–1100 нм. Для проведения анализа готовили рабочие растворы каждого из препаратов (по 3 серии) путем разведения водой для инъекций до концентрации семаглутида в растворе 0,025 мг/мл.

Масс-спектрофотометрический анализ (MALDI-TOF MS)

Подтверждение наличия пептида семаглутида в исследуемом отечественном препарате осуществляли методом масс-спектрофотометрии. Масс-спектры регистрировали на времяпролетном спектрометре Axima Confidence (Shimadzu Biotech, Япония) в рефлекторном режиме высокого разрешения с азотным лазером ($\lambda=337$ нм). Сканирование m/z проводили в диапазоне от 500 до 5000 Да, в качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (DHB) и синапиновую кислоту (SA).

Для приготовления мишени, препарат доводили до концентрации 1 мг/мл деионизированной водой, затем 20 мкл полученного раствора смешивали с 20 мкл раствора матрицы (10 мг/мл в 50% растворе ацетонитрила / 0,1% водная трифторуксусная кислота). Полученные смеси наносили на мишень из нержавеющей стали и сушили на воздухе.

Относительное молярное соотношение аминокислот

Относительное молекулярное соотношение аминокислот в препаратах определяли методом ВЭЖХ. Анализ проводили на жидкостном хроматографе высокого давления, снабженного УФ-детектором, Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies, США), с использованием колонки из нержавеющей стали AccQ Tag Amino Acid Analysis Column (150×3,9 мм, 4 мкм) при длине волн 254 нм.

Растворы препаратов гидролизировали путем добавления 6 М раствора хлористоводородной кислоты, содержащего 0,1% фенола и 1% тиогликолевой кислоты. Процесс гидролиза осуществляли при температуре 110°C в течение 24 ч. Дериватизацию гидролизатов испытуемых растворов и раствора стандартных образцов аминокислот проводили с использованием дериватизирующего реагента при нагревании растворов до 55°C в течение 10 мин.

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Метод эксклюзионной хроматографии использовали для определения количественного содержания высокомолекулярных примесей в препаратах. Анализ проводили на колонке Tosoh TSK-gel G 2000 SWXL (7,8×300 мм, 5 мкм) с помощью жидкостного хроматографа с УФ-детекцией Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies, США).

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

Метод обращенно-фазовой хроматографии использовали для определения количественного содержания семаглутида и родственных примесей в исследуемом и референтном препарате. Анализ проводили с помощью жидкостного хроматографа с УФ-детекцией Prominence (Shimadzu, Япония), с использованием колонки Jupiter 4u Proteo 90A (4,6×250 мм, 4 мкм; Phenomenex, США).

Сравнительные исследования биологической активности препаратов *in vitro*

Сравнительную биологическую активность исследуемого и референтного препарата оценивали *in vitro* на культуре клеток CHO-K1/GLP-1R (GenScript, США). Данная клеточная линия имеет рецепторы ГПП-1, с которыми связывается активное действующее вещество – семаглутид. Культивирование клеточной линии проводили с использованием культуральной среды RPMI (ПанЭко, Россия) с добавлением раствора пенициллина / стрептомицина (1%) и фетальной бычьей сыворотки (10%), при стандартных условиях (температура – 37±1°C, содержание CO₂ – 5±1%), в течение 2 сут. Оценку результатов проводили с помощью набора cAMP-Glo™ Assay (Promega, США) в соответствии с инструкцией.

Биоэквивалентность и сопоставимость профиля безопасности, переносимости и иммуногенности

Было проведено открытое рандомизированное параллельное сравнительное исследование отечественного препарата Квинсента® (семаглутид 1,34 мг/мл, ООО «Промомед», Россия), произведенного на основе синтетического семаглутида (далее – исследуемый препарат), и зарубежного препарата Оземпик® (семаглутид 1,34 мг/мл, Ново Нордиск А/С, Дания), в составе которого содержится молекула, полученная биотехнологическим путем (далее – референтный препарат / препарат сравнения). Исследуемый и референтный препарат были сопоставимы по составу.

Дизайн исследования

Данное исследование являлось одноцентровым открытым рандомизированным параллельным исследованием биоэквивалентности в условиях однократного подкожного введения исследуемого препарата / препарата сравнения натощак здоровым добровольцам.

Схема дизайна исследования представлена на рисунке 1.

Объекты исследования и критерии соответствия

Всего в исследование было включено 54 здоровых добровольца, мужского и женского пола в возрасте от 18 до 45 лет (34,20±6,25 лет). Все участники подписали форму информированного согласия, а также изъявили способность и желание выполнять все предписания Протокола исследования.

Основными критериями включения были: масса тела >50 кг; ИМТ 18,5–26 кг/м² включительно; верифицированный диагноз «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования; отрицательные результаты тестов на употребление алкоголя, психотропных и наркотических веществ и готовность отказаться от употребления алкоголя в течение участия в исследовании. Участники были предупреждены о необходимости использовать надежные методы контрацепции и воздержаться от донорства спермы на протяжении всего исследования и в течение 2-х мес после его окончания.

К основным критериям не включения относили: наличие отягощенного аллергологического анамнеза, лекарственной непереносимости, хронических заболеваний различных систем органов; психических заболеваний; гиперчувствительность к препаратам исследования; применение в анамнезе семаглутида или других аналогов человеческого ГПП-1 (в течение менее 6 мес до скрининга), приём лекарственных препаратов, оказывающих выраженное влияние на гемодинамику и/или функцию печени в течение менее 2 мес до скрининга; приём других лекарственных препаратов, включая растительные и гомеопатические препараты, витаминов и/или биологически активных добавок (БАД), в течение менее 4 недель до скрининга; невозможность проведения подкожных инъекций; любые трудности с отбором крови в анамнезе или любые вазовагальные приступы во время отбора крови; хирургические вмешательства на ЖКТ (за исключением аппендэктомии) в анамнезе. Также участники не рассматривались для включения в исследование в случае наличия следующих заболеваний и состояний: медуллярный рак щитовидной железы в анамнезе, в том числе в семейном; множественная эндокринная неоплазия 2 типа в анамнезе; тяжёлая депрессия; суицидальные мысли или поведение, в том числе в анамнезе; острые инфекционные заболевания или симптомы ОРВИ в течение менее 4 недель до скрининга.

Добровольцев исключали из исследования в случае отказа от участия в клиническом исследовании, при приёме препаратов запрещённой терапии и положительном тесте на употребление алкоголя, психотропных и/или наркотических веществ, при наличии грубых нарушений требований и процедур Протокола исследования, возникновения нежелательных явлений, а также при появлении в ходе исследования у добровольца любых заболеваний или состояний, которые делали невозможным дальнейшее его участие в исследовании. Врач-исследователь мог принять решение об исключении добровольца в интересах самого добровольца.

Оценку сопутствующей терапии и критериев исключения проводили на протяжении всего участия добровольца в исследовании. Общая

продолжительность исследования для каждого добровольца составляла не более 35 дней (с учетом периода скрининга).

Процедура рандомизации

Каждому добровольцу, соответствовавшему всем критериям включения и не соответствовавшему ни одному из критериев не включения, был присвоен рандомизационный номер в соответствии с планом рандомизации, подготовленным для данного исследования в программе WinPepi 11.65 (модуль ETCETERA 3.26) методом генерации случайных чисел. Рандомизационный номер добровольца вносил врач-исследователь в Журнал учета участников клинического исследования в скрининге / рандомизации. Если доброволец преждевременно прекращал участие в исследовании, его рандомизационный номер повторно не использовали, и доброволец впоследствии уже не мог вернуться в исследование.

Условия проведения и продолжительность исследования

Исследование было проведено с 10 июля по 02 октября 2023 года на базе исследовательского центра ГБУЗ Ярославской области «Клиническая больница № 3» (Ярославль, Россия).

Описание манипуляций и методологии

Введение препаратов

Добровольцы, соответствовавшие критериям включения и не соответствовавшие критериям не включения, были рандомизированы в 2 группы в соотношении 1:1. Группа I ($n=27$) получала российский семаглутид (исследуемый препарат), группа II ($n=27$) – препарат сравнения / референтный препарат. Введение препарата сравнения / исследуемого препарата осуществлял медицинский персонал в утренние часы натощак в дозе 0,5 мг однократно подкожно в область живота.

Выбор доз для данного исследования был основан на информации, представленной в действующей инструкции по медицинскому применению референтного препарата, и статьях, посвященных изучению препаратов семаглутида. В отличие от стартовой дозы – 0,25 мг, доза 0,5 мг являлась минимально терапевтической. Выбор данной дозы был основан на безопасности применения у здоровых добровольцев, поскольку при применении семаглутида в дозе более 0,5 мг существовал риск развития побочных явлений со стороны ЖКТ. Кроме того, имелся опыт применения семаглутида в дозе 0,5 мг у здоровых добровольцев, показавший хорошую переносимость¹³ [23–26]. Способ введения

¹³ NCT02060266 Trial Investigating the Absorption, Metabolism and Excretion After a Single Subcutaneous Dose of [3H]-Semaglutide in Healthy Male Subjects. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02060266>

соответствовал способу применения референтного препарата¹⁴ и планируемому способу применения исследуемого препарата в клинической практике¹⁵.

Для введения исследуемого препарата / препарата сравнения добровольцы были госпитализированы в стационар вечером накануне и не менее чем за 10 ч до введения препарата. На период нахождения в стационаре добровольцы соблюдали правила пребывания в нем. Длительность госпитализации составляла не более 3 сут. В течение всего исследования, от начала скринингового обследования и до завершения заключительного осмотра, добровольцы воздерживались от приема пищи не менее чем за 10 ч до введения исследуемого препарата / препарата сравнения.

Подготовка и отбор проб

После рандомизации и перед отбором исходных проб крови для оценки фармакокинетических параметров и параметров иммуногенности добровольцам был установлен кубитальный гепаринизированный катетер, который был удален после отбора пробы крови в точке 12 ч (день 1). После удаления катетера отбор крови у добровольцев проводился путем венепункции.

Отбор проб крови для определения фармакокинетических параметров осуществляли в следующие временные точки: 1, 0,5, 0 ч (день 1) до введения исследуемого препарата / препарата сравнения и далее через 2, 8, 12 (день 1), 24 (день 2), 36 (день 2), 48 (день 3), 72 (день 4), 96 (день 5), 144 (день 7), 192 (день 9), 240 (день 11), 360 (день 16) и 480 ч (день 21) после введения исследуемого препарата / препарата сравнения.

Отбор проб крови для изучения иммуногенности осуществляли не более чем за 15 мин до введения исследуемого препарата / препарата сравнения (исходная (0) проба) и через 480 ч (день 21) после их введения. Отбор проб крови для анализа параметров иммуногенности осуществляли отдельно от проб крови для оценки фармакокинетических параметров.

Таким образом, в исследовании проводился отбор 16 проб крови для каждого добровольца (по 6 мл каждый) для исследования фармакокинетических параметров и 2 пробы крови для каждого добровольца (по 6 мл каждый) для исследования иммуногенности.

На скрининге, на этапе госпитализации (утром перед рандомизацией), при выписке из стационара и в День 11 и 21 исследования проводились отборы крови для проведения клинического, биохимического анализов и/или определения уровня глюкозы в крови с помощью глюкометра, общий объем которых в каждый указанный день составил не более 15 мл.

¹⁴ Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. Оземпик®. — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=9859f6af-8ad6-4704-9d20-1bcc87b7dafc

¹⁵ Там же.

Отбор образцов крови производили в пробирки для получения сыворотки с активатором свертывания. После образования сгустка пробирки центрифугировали, полученную сыворотку аккуратно переносили в предварительно промаркированные криопробирки, разделяя сыворотку на три аликвоты по 500 мкл: две для основного анализа (аликвоты А и В), третья для повторных анализов (аликвота С). Образцы сыворотки замораживали сразу после получения и переноса в криопробирки и хранили при температуре не выше -70°C .

Аналитический метод

Оценку фармакокинетики проводили по концентрации семаглутида в плазме крови и антител к нему в сыворотке крови каждого добровольца после подкожного введения исследуемого препарата / препарата сравнения. В целях всесторонней характеристики фармакокинетических свойств исследуемого препарата / препарата сравнения в исследовании был предусмотрен отбор проб крови, позволяющий охватить весь фармакокинетический профиль, включая фазу элиминации. Количественное определение семаглутида в образцах сыворотки крови методом ИФА было проведено с помощью фотометра для микропланшетов, HiPo MPP-96 (Biosan, Латвия). Расчет концентраций семаглутида проводили при помощи программного обеспечения «GraphPad Prism 8.4.3». Определение семаглутида в образцах сыворотки крови осуществляли с помощью предварительно валидированного метода иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерчески доступных наборов «KRIBIOLISA™ Semaglutide (Ozempic™) ELISA»; антител к семаглутиду с помощью набора «KRIBIOLISA™ Anti-Liraglutide ELISA». Аналитический диапазон составил 50–4000 пг/мл. Приготовление калибровочных образцов из набора осуществляли путем разведения стандартного образца. Аналитический диапазон выбран в соответствии с инструкцией к набору.

Оценка безопасности и переносимости

Вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов был сделан с использованием подхода, основанного на оценке 90% доверительных интервалов (ДИ) для отношений средних геометрических значений параметров $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ семаглутида в исходных единицах измерения. Препараты были признаны биоэквивалентными, если границы оцененного ДИ для $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ семаглутида находились в пределах 80,00–125,00%.

В ходе исследования было проведено клиническое наблюдение за добровольцами с оценкой данных физикального осмотра, включая опрос о жалобах добровольца, основных жизненно важных показателей (АД, ЧСС, ЧДД, температура

тела), ЭКГ в 12 отведениях, лабораторных показателей клинического, биохимического анализов крови, общего анализа мочи, определения уровня глюкозы с помощью глюкометра.

Критерии оценки безопасности и переносимости включали в себя частоту и степень тяжести нежелательных явлений (НЯ), зарегистрированных по данным отклонений от нормы результатов лабораторных анализов, физикального осмотра, оценки жизненно важных показателей, ЭКГ; количество случаев досрочного прекращения участия в исследовании из-за развития НЯ и/или серьезных нежелательных явлений (СНЯ), в том числе связанных с исследуемым препаратом / препаратом сравнения; частоту добровольцев с обнаруженными антителами к семаглутиду; оценку общей переносимости исследуемого препарата / препарата сравнения по шкале Лайкерта. Оценку безопасности и переносимости лираглутида проводили для всех добровольцев. Выявление НЯ происходило с момента введения исследуемых препаратов до момента завершения участия добровольца в исследовании.

Фармакокинетические параметры¹⁶: максимальная концентрация вещества в сыворотке крови (C_{max}); время достижения C_{max} (T_{max}); площадь под кривой «концентрация–время» с момента введения лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t ($AUC_{(0-t)}$); площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$); отношение значений площади под кривой «концентрация – время» с момента введения лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t к площади под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности ($AUC_{(0-t)} / AUC_{(0-\infty)}$); константа скорости терминальной элиминации (K_{el}); период полувыведения ($T_{1/2}$); объем распределения (V_d); остаточная (экстраполируемая) площадь под кривой, определяемая по формуле: $V_d = AUC_{(0-\infty)} - AUC_{(0-t)} / AUC_{(0-\infty)} (AUC_{(t-\infty)})$.

Этическое одобрение

Исследование соответствовало этическим принципам, изложенным в Хельсинской декларации последнего пересмотра, правилам Надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза, Правилам надлежащей клинической практики Международного совета по гармонизации (ICH E6 GCP R2), а также другим законодательным актам, применимым к данному исследованию. Протокол клинического исследования был одобрен

Минздравом России (разрешение № 347 от 05 июля 2023 года) и Советом по этике Минздрава России (выписка из протокола № 337 заседания от 27 июня 2023 года), а также Локальным независимым этическим комитетом при исследовательском центре государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница № 3» (выписка из протокола № 186 заседания от 07 июля 2023 года).

Статистический анализ

Для расчёта численности участников использовали данные о коэффициентах внутрииндивидуальной вариабельности (CV_{inter}) параметров C_{max} , AUC_{0-t} семаглутида, представленных в Assessment Report Ozempic¹⁷. По результатам исследования после однократного подкожного введения здоровым добровольцам CV_{inter} семаглутида для основных фармакокинетических параметров C_{max} и AUC не превышал 24. Расчет необходимой численности был выполнен при помощи программы PASS 11.4.12.

Для стандартных условий дизайна с двумя параллельными группами, принимая в расчет, что 90% ДИ составили 80,00–125,00%, $CV_{inter} = 24\%$, $\alpha = 0,05$, мощность исследования – 80%, отношение групп составило 0,95, было необходимо включение не менее 50 здоровых добровольцев, которые полностью завершили исследование и были приняты в статистический анализ. С учетом возможного выбывания в ходе исследования была запланирована рандомизация 54 здоровых добровольцев (по 27 добровольцев в каждую исследуемую группу).

Для фармакокинетических расчётов было использовано фактическое время отбора проб крови. Расчет фармакокинетических параметров, статистический анализ показателей безопасности и оформление результатов проводили с использованием статистических пакетов (StatSoft Statistica версия 13.3 и с помощью программы R Project (версия 3.5.1, лицензия GPL-2/GPL-3) с расширением *beaR*, версия 2.8.3-2. Промежуточный анализ не проводился.

Для всех фармакокинетических показателей рассчитывались следующие статистические параметры: среднее арифметическое, среднее геометрическое, стандартное отклонение среднего, коэффициент вариации, медиана, минимальное и максимальное значения, разброс.

Статистический анализ проводили, исходя из предположения о лог-нормальном распределении $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$, C_{max} и нормальном распределении остальных фармакокинетических параметров,

¹⁶ При необходимости могли быть проведены дополнительные фармакокинетические расчеты.

¹⁷ Assessment report Ozempic EMA/21773/2022. 11 November 2021. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/ozempic-h-c-004174-x-0021-epar-assessment-report-variation_en.pdf

за исключением $T_{\max}$. После проведения логарифмического преобразования эти показатели анализировались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Статистический анализ исследования проводился при стандартном уровне значимости $\alpha=0,05$.

Для рандомизированного сравнительного исследования в параллельных группах статистическая модель дисперсионного анализа включала следующий фактор, вносящий вклад в наблюдаемую вариацию данных: препарат. Дисперсионный анализ применялся для проверки гипотез о статистической значимости вклада указанного фактора в наблюдаемую вариабельность.

Вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов был сделан с использованием подхода, основанного на оценке 90% ДИ для отношений средних геометрических значений параметров $C_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$ семаглутида в исходных единицах измерения.

Для всех показателей безопасности и переносимости, собранных в ходе исследования, представлена описательная статистика. Для анализа частотных показателей было проведено сравнение долей при помощи двустороннего варианта точного критерия Фишера или критерия χ^2 . Для сравнения количественных непрерывных показателей использовали t -критерий Стьюдента (в случае нормального распределения) или U -критерия Манна-Уитни (в случае распределения, отличного от нормального). Статистически достоверными считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические свойства и биологическая активность

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой области (200–400 нм)

Результаты спектрофотометрического определения исследуемого препарата / препарата сравнения представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что спектры поглощения зарубежного препарата сравнения Оземпик® и отечественного исследуемого препарата Квинсента® по положению максимумов и минимумов поглощения в области 200–400 нм соответствовали друг другу, что в свою очередь свидетельствует об идентичности исследуемых препаратов.

Масс-спектрофотометрический анализ (MALDI-TOF MS)

Результаты анализа MALDI-TOF MS подтверждают наличие в исследуемом отечественном препарате

пептида с массой 4,1 кДа¹⁸, соответствующего массе семаглутида препарата сравнения (Рис. 3).

Относительное молярное соотношение аминокислот

В ходе проведенного исследования были получены сопоставимые молярные соотношения аминокислот в образцах исследуемых препаратов Оземпик® и Квинсента® (табл. 2).

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Полученные в рамках исследования результаты продемонстрировали сопоставимость времени удерживания высокомолекулярных примесей белков. Более того, на момент проведения анализа исследуемый отечественный препарат семаглутида содержал в среднем в 1,6 раз меньше высокомолекулярных примесей, чем зарубежный.

Типовые хроматограммы, полученные при определении содержания высокомолекулярных примесей в исследуемом и референтном препарате представлены на рисунках 4 и 5. Результаты анализа содержания высокомолекулярных примесей представлены на рисунке 6.

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

Результаты определения количественного содержания семаглутида и родственных примесей в исследуемом препарате и препарате сравнения представлены в таблице 3.

Полученные данные демонстрируют, что на момент проведения анализа, содержание примесей в отечественном препарате «Квинсента» было в 2,5 раза ниже по сравнению с зарубежным препаратом. При этом зарубежный препарат содержал в среднем в 5,6 раз больше гидрофильных примесей, и практически в 2 раза больше гидрофобных примесей в сравнении с отечественным препаратом.

Сравнительное исследование биологической активности

Полученные данные сравнительного анализа биологической активности исследуемого и референтного препарата *in vitro* представлены в таблице 4.

Результаты демонстрируют наличие сопоставимой биологической активности исследуемого отечественного препарата с химически синтезированным активным веществом, зарубежному препарату: диапазон активности исследуемых препаратов находился в пределах 80–120% по отношению к стандартному образцу (CO) семаглутида.

¹⁸ Assessment report Ozempic, semaglutide, Procedure No. EMEA/H/C/004174/0000, 14 December 2017, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ozempic-epar-public-assessment-report_en.pdf

**Биоэквивалентность и сопоставимость
профиля безопасности и переносимости****Популяция**

Все добровольцы были включены в популяцию для оценки безопасности, переносимости и иммуногенности, для анализа фармакокинетики и оценки биоэквивалентности. Средний возраст добровольцев в популяции составил $34,20 \pm 6,25$ лет, средняя масса тела – $70,41 \pm 9,42$ кг, средний рост – $172,61 \pm 7,38$ см, средний показатель ИМТ – $23,51 \pm 1,39$ кг/м². Демографические и исходные антропометрические характеристики добровольцев не отличались между группами (табл. 5 и 6).

Фармакокинетика и биоэквивалентность

Средние значения основных и дополнительных фармакокинетических параметров после применения российского и референтного препарата представлены в таблице 7.

Как следует из представленных данных, средние значения как основных, так и дополнительных фармакокинетических параметров, полученных после применения исследуемого и референтного препаратов, были сопоставимы между собой. Можно сделать заключение о схожем фармакокинетическом профиле исследуемого препарата и препарата сравнения.

Результаты оценки отношения геометрических средних параметров фармакокинетики AUC_{0-t} , C_{max} семаглутида исследуемых препаратов и 90%-ные ДИ для этих отношений демонстрируют эквивалентность основных фармакокинетических параметров (AUC_{0-t} , C_{max}) (табл. 8). По результатам статистического анализа полученные 90% ДИ для отношения значений C_{max} , AUC_{0-t} исследуемого российского и зарубежного препарата составили 90,89–109,15 и 91,66–111,27% соответственно. Коэффициенты внутрииндивидуальной вариации, рассчитанные на основании дисперсионного анализа, составили 20,29% для величины C_{max} и 21,50% для величины AUC_{0-t} .

Таким образом, интервалы, полученные в ходе исследования, полностью соответствовали пределу эквивалентности 80,00–125,00% для показателей C_{max} и AUC_{0-t} , наглядно демонстрируя биоэквивалентность исследуемого препарата.

Безопасность

Все добровольцы завершили исследование полностью в соответствии с утвержденным Протоколом. В ходе исследования у добровольцев не было зарегистрировано НЯ. В 100% (54) случаев у добровольцев переносимость была оценена как «хорошая». СНЯ в ходе проведения исследования и после его завершения у добровольцев не выявлено. Смертельные случаи не наблюдались. Случаев возникновения беременности половой партнерши участника исследования во время

проведения исследования и после его завершения зарегистрировано не было. Не обнаружено отклонений от нормы по результатам клинического и биохимического анализа крови, определения уровня глюкозы в крови, общего анализа мочи, параметров основных жизненно важных показателей, физического осмотра и ЭКГ.

Оценка иммуногенности

По результатам анализа параметров иммуногенности у добровольцев не были выявлены антитела к семаглутиду в сыворотке крови, что свидетельствовало об отсутствии иммуногенности препарата. Неожиданные результаты при проведении исследования не отмечены.

Таким образом, исследуемый препарат семаглутида и препарат сравнения имели сходный профиль безопасности. При этом для российского препарата не было отмечено случаев иммуногенности, что подтверждает высокий профиль безопасности и снижение риска отсутствия эффективности терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность и безопасность семаглутида по сравнению с плацебо, либо активными препаратами сравнения (ситаглиптин, эксенатид, инсулин гларгин, дулаглутид, лираглутид) у взрослых пациентов с СД 2, последовательно изучались в серии клинических исследований III фазы, объединенных крупной исследовательской программой SUSTAIN, включившей в общей сложности более 10 тыс. пациентов [27–33]. Терапия семаглутидом была достоверно лучше плацебо и препарата сравнения и позволила снизить HbA1c на 1,2–1,5% при использовании дозы 0,5 мг и на 1,5–1,8% при использовании дозы 1,0 мг, по сравнению с исходными значениями, и привела к достижению целевых значений HbA1c <7,0% у 78,7% пациентов, а HbA1c <6,5% у 66,7% пациентов [27–32]. Стоит отметить, что 74,3% субъектов, получавших семаглутид, достигли комбинированной конечной точки HbA1c <7,0% без тяжелой либо симптомной гипогликемии или прибавки в весе. Напротив, 65,7% пациентов, получавших семаглутид, достигли снижения веса на 5% и более, а 26,7% – на 10% и более, что было достоверно лучше по сравнению с группой плацебо и группой сравнения [27, 31, 32].

В ретроспективном обсервационном исследовании было также показано, что семаглутид в дозе 0,5–1,0 мг спустя 32 недели лечения снижал HbA1c в среднем на 1,38%, вес – на 6,03 кг, значительно улучшал показатели АД и липидного спектра, сокращал число принимаемых сахароснижающих и гиполипидемических препаратов, приводил к лучшей удовлетворенности пациентов результатами контроля СД и пищевым поведением [34].

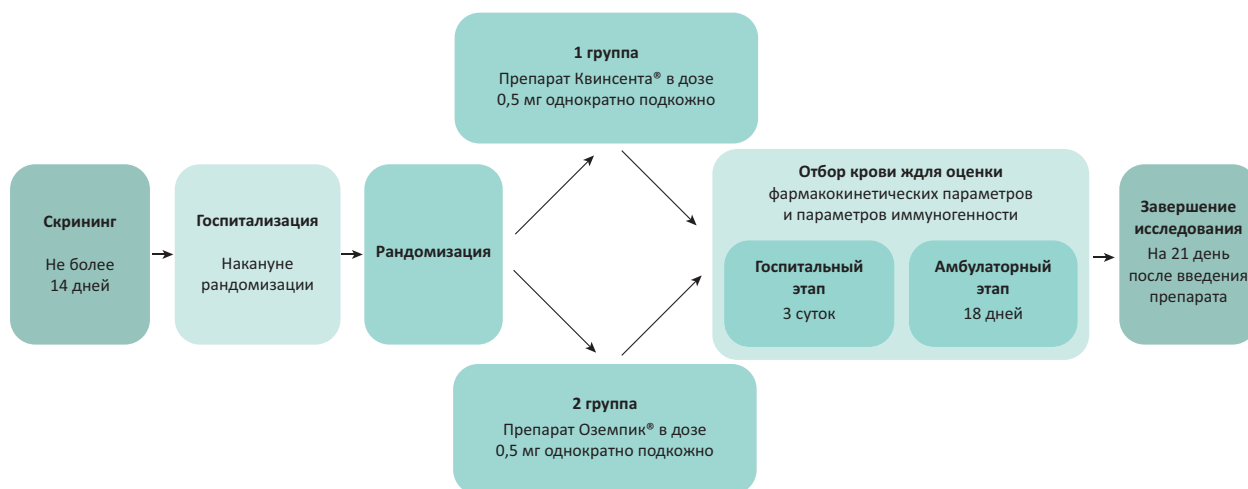


Рисунок 1 – Дизайн исследования

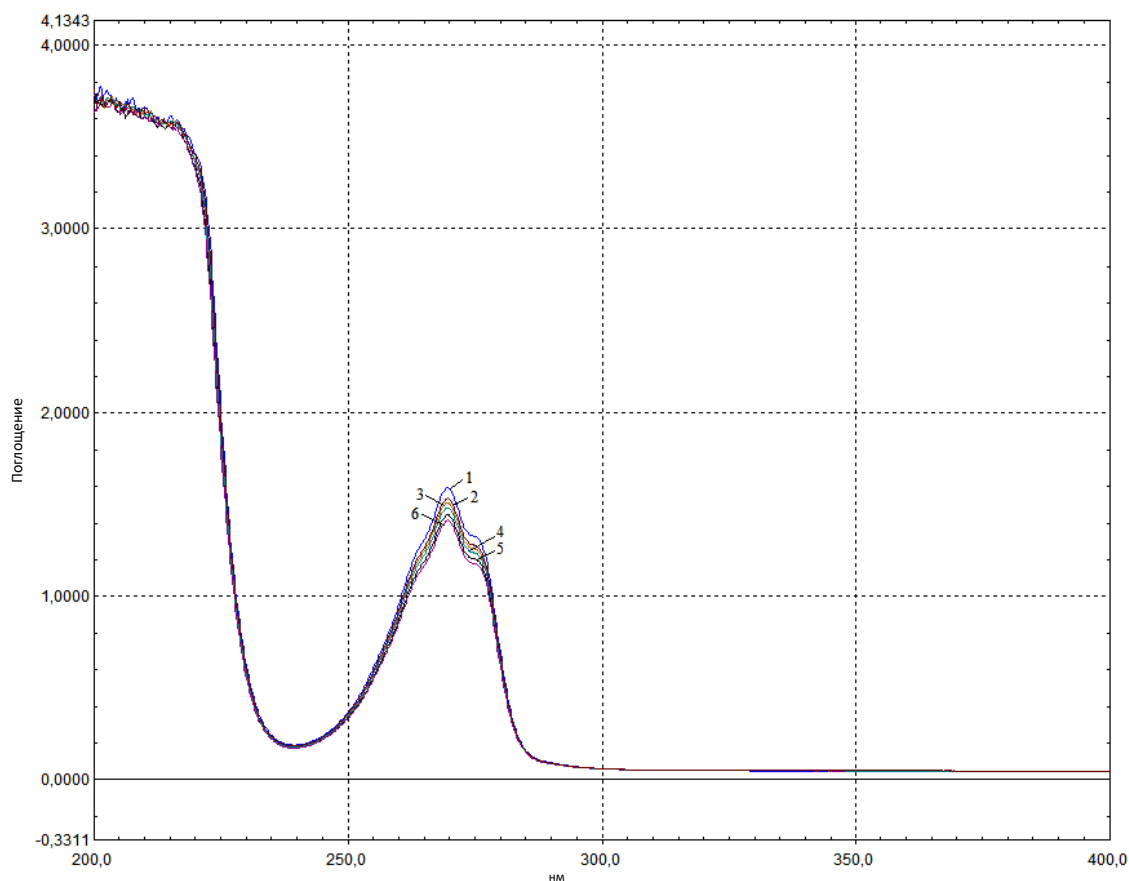
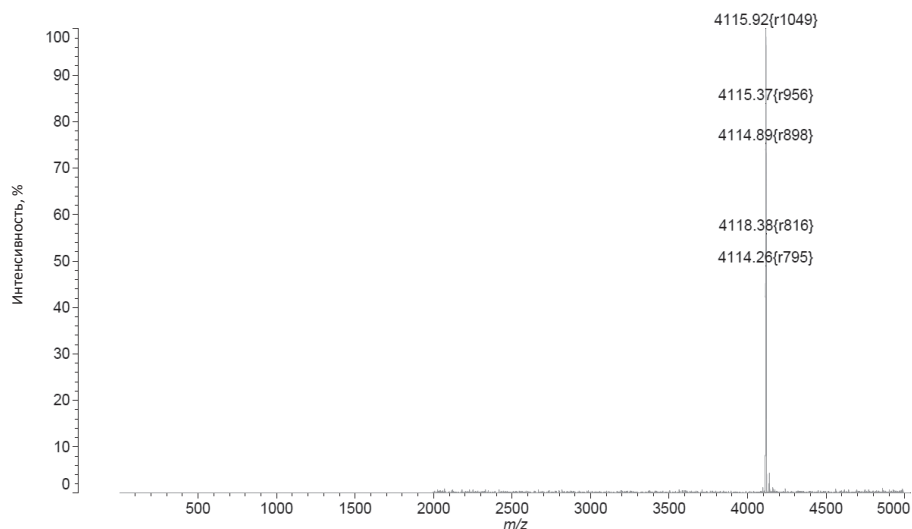


Рисунок 1 – Наложение спектров поглощения исследуемого и референтного препарата

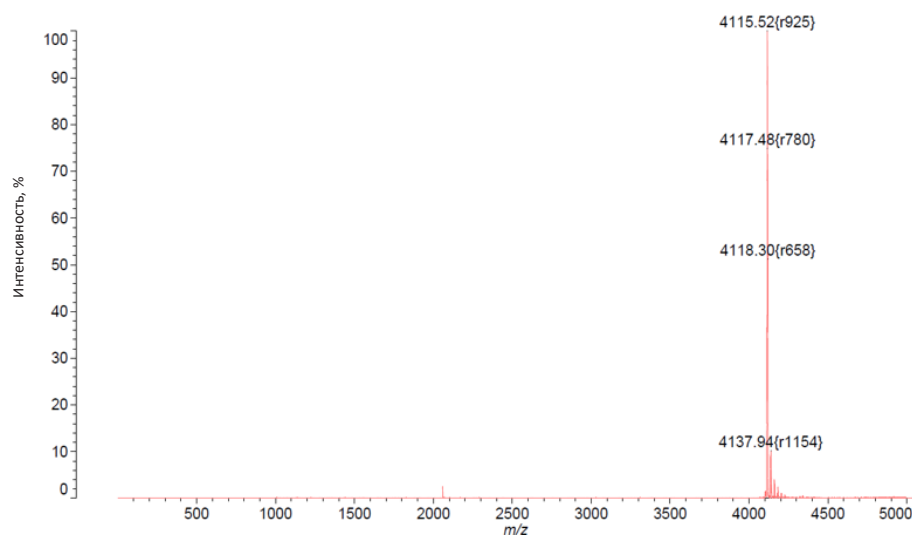
Серия 1

Shimadzu Biotech Axima Confidence 2.9.8.1: Mode Reflectron_HiRes, Power: 90, Blanked, P.Ext. @ 4114 (bin 148)
4.5 mV[sum= 288 mV] Profiles 157- 220 Smooth Av 1



Серия 2

Shimadzu Biotech Axima Confidence 2.9.8.1: Mode Reflectron_HiRes, Power: 83, Blanked, P.Ext. @ 4114 (bin 148)
52 mV[sum= 4675 mV] Profiles 98- 187 Smooth Av 1



Серия 3

Shimadzu Biotech Axima Confidence 2.9.8.1: Mode Reflectron_HiRes_neg, Power: 79, Blanked, P.Ext. @ 4114 (bin 148)
14 mV[sum= 720 mV] Profiles 48- 98 Smooth Av 1



Рисунок 3 – Масс-спектры MALDI-TOF MS, полученные при исследовании трех серий исследуемого препарата Квинсента®

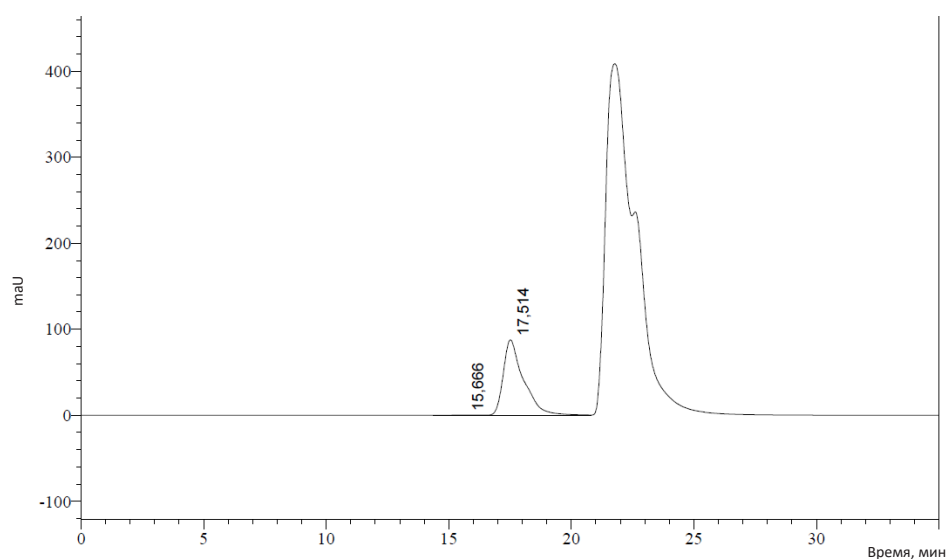


Рисунок 4 – Хроматограмма, полученная при определении содержания высокомолекулярных белков в референтном препарате

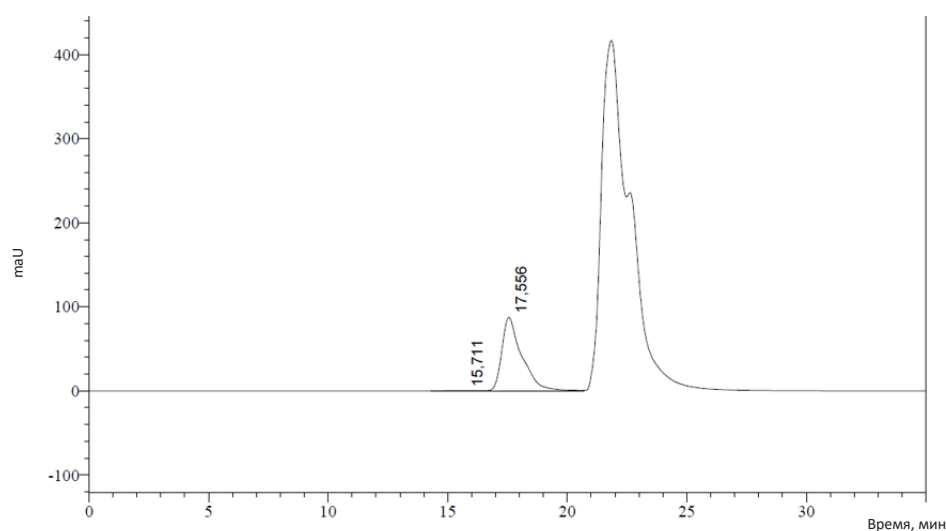


Рисунок 5 – Хроматограмма, полученная при определении содержания высокомолекулярных белков в отечественном исследуемом препарате

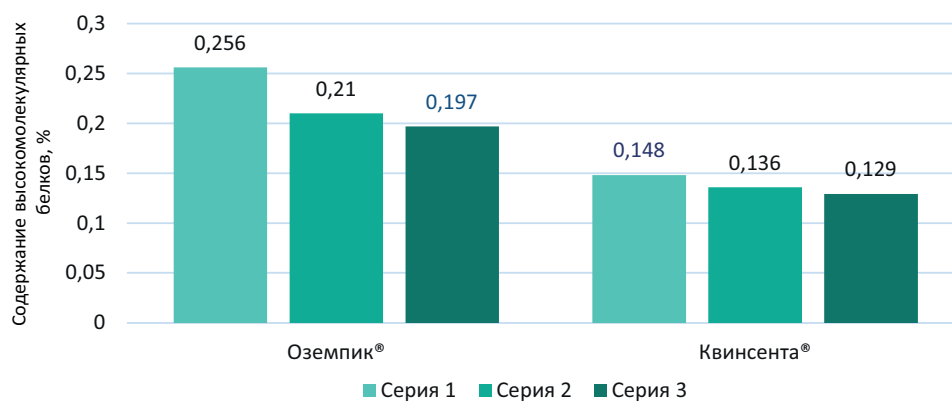


Рисунок 6 – Результаты анализа содержания высокомолекулярных примесей в исследуемом и референтном препарате

**Таблица 1 – Результаты спектрофотометрического анализа
исследуемого препарата / препарата сравнения в УФ-области**

№	Объект анализа	Серия	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\min}$
1	Референтный препарат	1	269,6	239,4
2		2	269,7	239,2
3		3	269,4	239,5
4	Исследуемый препарат	1	269,6	239,7
5		2	269,3	239,2
6		3	269,1	239,6

**Таблица 2 – Результаты определения относительного молярного соотношения аминокислот
в образцах исследуемого и референтного препарата**

Наименование аминокислоты	Относительное молярное соотношение аминокислот					
	Оземпик®			Квинсента®		
	Серия № 1	Серия № 2	Серия № 3	Серия № 1	Серия № 2	Серия № 3
Asp	1,1	0,9	1,2	0,9	1,0	1,1
Glu	5,0	5,3	5,4	5,2	5,0	4,9
His	1,1	0,9	1,2	1,0	1,1	0,9
Thr	1,9	2,0	2,3	2,2	1,8	2,1
Aeea	1,9	1,7	1,9	2,0	1,8	1,9
Tyr	1,0	0,9	1,1	1,1	0,8	1
Lys	1,0	1,1	1,0	1,2	0,9	1,1
Leu	2,1	1,8	2,1	1,9	2,2	2,2
Ser	2,7	2,5	2,9	3,1	2,8	2,6
Gly	4,1	4,4	3,9	4,0	4,2	3,8
Arg	2,0	1,7	2,2	1,8	2,1	1,9
Ala	3,0	2,7	2,9	2,8	2,9	3,3
Aib	1,0	0,8	1,0	0,9	1,1	1,1
Val	2,0	2,3	1,8	1,9	2,1	2
Ile	1,0	1,2	0,9	0,9	1,0	1,2
Phe	2,0	1,7	2,1	2,2	1,9	2
Trp	1,0	1,0	0,7	1,0	0,8	1,1

Таблица 3 – Результаты количественного определения родственных примесей методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в исследуемом и референтном препарате

Показатель	Оземпик®			Квинсента®		
Серия	1	2	3	1	2	3
Количественное определение семаглутида, мг/мл	1,35	1,34	1,33	1,37	1,39	1,35
Сумма примесей, %	2,683	2,312	2,751	0,944	1,124	1,036
Гидрофильные примеси, %	0,821	0,933	1,06	0,135	0,215	0,148
Гидрофобные примеси 1, %	1,737	1,308	1,62	0,716	0,834	0,825
Гидрофобные примеси 2, %	0,125	0,071	0,049	0,093	0,075	0,063

**Таблица 4 – Результаты сравнительного исследования биологической активности
отечественного и зарубежного препарата**

Препарат	№ серии	EC 50	% активности от СО
Оземпик®	1	1,379	93,62
	2	1,725	117,11
	3	1,232	83,64
Квинсента®	1	1,317	89,41
	2	1,731	117,52
	3	1,559	105,84
СО семаглутида	—	1,473	—

Примечание: СО – стандартный образец.

Таблица 5 – Описательная характеристика демографических и антропометрических данных добровольцев

Показатель	n	p	Квинсента®			Оземпик®		
			Среднее значение	ДИ –95,000%	ДИ 95,000%	Среднее	ДИ –95,000%	ДИ 95,000%
Возраст, полных лет	27	0,085940	35,6667	33,1337	38,1997	32,7404	30,4273	35,0541
Масса тела, кг	27	0,119176	72,2222	68,3608	76,0837	68,6037	65,0962	72,1112
Рост, см	27	0,310119	173,7407	170,8119	176,6695	171,4815	168,5841	174,3788
ИМТ, кг ² /м	27	0,161126	23,7952	23,2588	24,3316	23,2274	22,6794	23,7754

Примечание: ДИ – доверительный интервал; ИМТ – индекс массы тела.

Таблица 6 – Анализ распределения по полу

Пол	Сравн. групп, критерий Пирсона χ^2	Квинсента®		Оземпик®	
		Частота	Процент	Частота	Процент
м	0,5859	14	51,85185	12	44,44444
ж	0,5859	13	48,14815	15	55,55556

Таблица 7 – Значение рассчитанных доверительных интервалов для фармакокинетических параметров

Параметр	Соотношение средних	90% ДИ		Допустимое значение, %
		Ниж. граница	Верх. граница	
AUC _{0-t}	1,00	91,66	111,27	80–125
C _{max}	0,99	90,89	109,15	80–125

Кроме того, семаглутид, по сравнению с ликсисенатидом, эксенатидом, лираглутидом, альбиглутидом и дулаглутидом, продемонстрировал самые высокие показатели улучшения ГК и снижения веса [35]. Аналогичное преимущество было так же показано в ходе двух метаанализов, сравнивавших результаты исследований семаглутида с результатами исследований ингибиторов натрий-глюкозного котранспортера-2 (ИНГЛТ-2) эмпаглифлозина, канаглифлозина и дапаглифлозина у лиц с неадекватным контролем СД 2, одним-двумя пероральными сахароснижающими препаратами [36] или монотерапией метформином [37] выявивших, что семаглутид превосходит ИНГЛТ в отношении снижения уровня HbA1c и снижении веса.

Еще одним важным преимуществом семаглутида является низкий риск гипогликемии, однако риск увеличивается при его сочетании с препаратами сульфонилмочевины и/или инсулином [38].

Но, пожалуй, самое ценное качество было обнаружено в результатах исследования SUSTAIN 6, которое продемонстрировало, что подкожное введение семаглутида по сравнению с плацебо было ассоциировано со значительным снижением частоты смерти, связанной с ССЗ, нефатального инфаркта миокарда или несмертельных нарушений мозгового кровообращения ($p < 0,001$) (комбинированный ОР=0,74; 95% ДИ от 0,58 до 0,95) а также с меньшим количеством случаев нефропатии [39]. В настоящее время продолжается специализированное исследование (FLOW; NCT03819153), изучающее

влияние подкожного введения семаглутида на почечные исходы у людей с СД 2 и хронической болезнью почек (ХБП).

Ретроспективный анализ так же показал [40], что при приеме семаглутида наблюдалось снижение относительного и абсолютного риска серьезных нежелательных сердечно-сосудистых событий по сравнению с препаратами сравнения. Хотя абсолютное снижение риска было небольшим, наблюдалась тенденция ($p=0,06$) к наибольшему снижению относительного риска у лиц с наименьшим сердечно-сосудистым риском. Этот феномен может быть объяснен тем, что более поздние стадии СД могут быть более устойчивыми к благотворному влиянию аргПП-1 на исходы ССЗ.

Другим пулом исследований было изучение эффективности и безопасности применения семаглутида в снижении веса у пациентов с избыточной массой тела и ожирением без СД в ходе программы клинических исследований STEP. Так, в исследованиях STEP 1, 3, 4, и 8 семаглутид в дозе 2,4 мг 1 раз в неделю приводил к средней потере веса на 14,9–17,4% от исходного уровня к 68-й неделе, при этом 69–79% участников достигли потери веса $\geq 10\%$, а 51–64% достигли потери веса $\geq 15\%$ [41–44]. В исследовании STEP 5 средняя потеря веса при приеме семаглутида в дозе 2,4 мг к 104-й неделе составила 15,2% от исходного уровня по сравнению с 2,6% при приеме плацебо [45]. Так же было выявлено улучшение основных кардиометаболических факторов риска: уменьшение окружности талии, снижение артериального давления, нормализация

показателей липидного спектра и С-реактивного белка, а также улучшение физических функций и качества жизни при хорошем профиле безопасности семаглутида [41–45, 45, 46].

Bandyopadhyay S. и соавт. [47] провели систематический обзор и метаанализ по оценке эффективности и безопасности терапии семаглутидом у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и неалкогольным стеатогепатитом и выявил достоверное снижение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), значительное снижение содержания липидов печени, улучшение ее эластичности, показателей HbA1c и липидного профиля.

Определение структурно связанных пептидных примесей и их характеристика является важнейшей задачей в фармацевтической разработке. Данные примеси могут возникать в результате разложения во время производства или хранения, а также влиять на эффективность и безопасность готового продукта [48]. В качестве примесей семаглутида могут выступать пептиды несовершенной структуры, образующиеся в результате вставки не желаемой аминокислоты или делеции (отсутствие одной или нескольких аминокислотных остатков), окисления или рацемизации аминокислот [49].

Существуют способы получения семаглутида методом твердофазного синтеза, позволяющие снизить образование рацемических примесей, упростить очистку целевого продукта, его чистоту и выход, а также снизить себестоимость [50, 51].

Биологическая активность пептидных молекул напрямую коррелирует с их размерным расположением атомов, в то время как инверсия конфигурации в определенном пептидном хиральном центре может вызвать локальное пространственное перераспределение критических функциональных групп [52]. Именно поэтому при разработке способа получения семаглутида методом химического синтеза особое внимание уделяется контролю рацемизации аминокислот.

В ходе анализа литературных данных, было выявлено, что в зарубежном препарате Оземпик® (Ново Нордиск А/С, Дания), содержащем в своем составе семаглутид биотехнологического происхождения, возможно образование трех изомеров, содержащих в своей структуре аминокислоты в D-конформации D-His¹, D-Ser⁸, D-Asp⁹. Как известно, изомеризация даже одной аминокислоты в определенной пептидной цепи может оказывать существенное влияние на общую конформацию пептидной молекулы и влиять на её биологическую активность [53, 54]. На основании данного факта, при разработке технологий получения субстанции семаглутида, для специалистов ГК «Промомед» основной задачей являлась минимизация количества потенциально возможных примесей.

На момент исследования отечественного и

зарубежного препаратов, было обнаружено, что Квинсента® (ГК «Промомед Рус», Россия), в составе которой семаглутид синтетического происхождения, содержит в 2,5 раза меньше примесей, в сравнении с зарубежным препаратом.

На основании полученных результатов в ходе сравнительных исследований, можно сделать вывод о том, что на сегодняшний день удалось добиться не только получения субстанции надлежащего фармакопейного качества, но и минимизировать образование побочных продуктов, снизив тем самым суммарное количество примесей в готовом лекарственном препарате. Важно отметить, что пептидные препараты, получаемые методом микробиологического синтеза, состоят из аминокислот в L-конформации, что соответствует процессу жизнедеятельности природных микроорганизмов, в то время как в процессе химического синтеза могут образовываться D-изомеры, которые, как указано выше, могут критически менять качество препарата и приводить к неожиданным фармакологическим эффектам. Таким образом, контроль процессов спонтанной изомеризации и получения продукта требуемой стереохимической чистоты, являются критическими для надлежащего качества препарата. В этой связи, стоит отметить, что в настоящий момент российский препарат Квинсента® является единственным отечественным препаратом на основе семаглутида, для которого используется собственная технология получения и очистки АФС, что обеспечивает высокий уровень контроля качества получаемого вещества, исключение нежелательных примесей и изомеризации а, следовательно, способствует достижению высокой эффективности и безопасности проводимой терапии.

Инъекционная терапия СД является наиболее эффективным методом лечения. Однако известно, что, несмотря на свою эффективность, данный метод терапии характеризуется низким уровнем приверженности, причем одним из способов преодоления этой проблемы является использование простых и удобных шприц-ручек [55]. Именно поэтому для российских лекарственных препаратов на основе арГПП-1, в частности, препарата Квинсента®, партнером ГК «Промомед» заводом ООО «Завод Медсинтез» была разработана особая шприц-ручка, обеспечивающая точность дозирования, простоту введения препарата, а также расходование лекарственного средства без излишних потерь на этапе подбора индивидуальной дозы и при длительном применении. Данная мультидозовая шприц-ручка обладает уникальным преимуществом, так как позволяет полностью использовать действующее вещество без остатка из картриджа. Согласно инструкции по применению препарата, если после инъекции селектор дозы остановился до того, как нулевая отметка совместиться с указателем. Данный факт означает,

что пациент из-за особенностей титрации не получил необходимую дозу препарата. В данной ситуации селектор дозы показывает число единиц, которое должно быть введено до полной дозы препарата из новой мультидозовой шприц-ручки. Подобной конструкции не предусмотрено ни у одной текущей зарегистрированной на отечественном рынке лекарственной формы арГПП-1. Отдельно стоит отметить, что вышеуказанная шприц-ручка совместима с иглами любых производителей, что важно с точки зрения возможного снижения доступности игл иностранного производства. Таким образом, можно говорить, что конструкция разработанной шприц-ручки для российских лекарственных препаратов на основе арГПП-1 компании ООО «Промомед Рус», в частности, лекарственного препарата Квинсента®, способствует не только повышению приверженности пациентов к лечению, но и обеспечивает фармакоэкономические преимущества терапии, исключая нерациональную утилизацию неиспользованного лекарственного средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований собрано достаточное количество данных, подтверждающих аналогичность физико-химических и биологических свойств препарата с химически синтезированным активным веществом семаглутид Квинсента® (раствор для подкожного введения 1,34 мг/мл, ООО «Промомед Рус», Россия) с референтным препаратом Оземпик® (раствор для подкожного введения 1,34 мг/мл, Ново Нордиск А/С, Дания). Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что качество, безопасность и эффективность российского препарата с синтетическим аналогом активного вещества подобны, а по некоторым параметрам даже превышают препарат сравнения.

Снижение социально-экономического бремени СД и ожирения является одной из важнейших задач системы здравоохранения РФ. Семаглутид может

являться препаратом выбора для пациентов с СД и ожирением, в частности, в сочетании с ССЗ, за счет высокой эффективности в отношении контроля уровня гликемии и снижении веса, восстановления параметров метаболического здоровья, доказанному протективному действию в отношении снижения рисков сердечно-сосудистых событий. Выход на рынок российских препаратов – арГПП-1 является важнейшим шагом к обеспечению пациентов необходимой терапией, особенно в условиях дефицита иностранных предшественников. В проведенном открытом рандомизированном перекрестном сравнительном исследовании биоэквивалентности, безопасности, переносимости и иммуногенности с участием здоровых добровольцев была подтверждена эквивалентность исследуемого лекарственного препарата Квинсента® и препарата сравнения Оземпик®, а также продемонстрирован высокий профиль безопасности, переносимости исследуемого препарата и отсутствие иммуногенности. На основании полученных данных препарат Квинсента® был зарегистрирован на территории РФ.

Современные аналитические методы полностью подтвердили структурную идентичность химически синтезированного семаглутида предшественнику, при этом разработанная технология позволила значительно уменьшить количество родственных примесей и повысить качество препарата. Использование в производстве препарата собственной технологии химического синтеза и очистки получаемой субстанции определяет требуемую стереохимическую чистоту продукта, снижение уровня примесей, прогнозируемые свойства и низкий риск неблагоприятных иммунных реакций. Целесообразным является проведение дальнейших клинических исследований для оценки эффективности и безопасности терапии пациентов с сахарным диабетом и ожирением или избыточным весом, а также для определения потенциально новых возможностей терапии арГПП-1, в том числе российским аналогом семаглутида.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Клиническое исследование проводилось при поддержке компании ООО «Промомед Рус».

Спонсор не оказывал влияние на выбор материала для публикации, анализ и интерпретацию данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.С. Аметов, Л.А. Балыкова – разработка концепции клинического исследования, анализ и описание результатов, корректировка текста; И.Е. Шохин – организация и проведение физико-химических исследований, интерпретация результатов; Е.А. Рогожина – организация и проведение исследований физико-химических и биологических свойств, обсуждение дизайна и результатов исследования;

Т.Г. Бодрова – анализ и подбор литературных источников, написание текста статьи, организация и проведение физико-химических исследований, интерпретация результатов; М.Е. Невретдинова – анализ и подбор литературных источников, интерпретация результатов, написание текста статьи; П.А. Белый –

реализация дизайна исследования, обработка данных исследования; К.Я. Заславская, В.С. Щербакова – разработка дизайна и концепции исследования, написание текста статьи; Д.В. Куркин – анализ и описание результатов; К.Н. Корянова – анализ и описание результатов, поиск и анализ литературных источников; Е.С. Мищенко – анализ и описание результатов; Э.Ю. Кесова, Е.Д. Козлов, Е.С. Самошкина, Д.Н. Андреев, Ю.Г. Казаишвили, С.М. Носков – разработка дизайна и концепции клинического исследования.

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Garber A.J., Handelsman Y., Grunberger G., Einhorn D., Abrahamson M.J., Barzilay J.I., Blonde L., Bush M.A., DeFronzo R.A., Garber J.R., Garvey W.T., Hirsch I.B., Jellinger P.S., McGill J.B., Mechanick J.I., Perreault L., Rosenblit P.D., Samson S., Umpierrez G.E. Consensus statement by the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the comprehensive type 2 diabetes management algorithm – 2020 EXECUTIVE SUMMARY // *Endocr Pract.* – 2020. – Vol. 26, No. 1. – P. 107–139. DOI: 10.4158/CS-2019-0472
- Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. 11-й выпуск // *Сахарный диабет.* – 2023. – Т. 26, № 25. – С. 1–231. DOI: 10.14341/DM13042
- Bancks M.P., Ning H., Allen N.B., Bertoni A.G., Carnethon M.R., Correa A., Echouffo-Tcheugui J.B., Lange L.A., Lloyd-Jones D.M., Wilkins J.T. Long-term absolute risk for cardiovascular disease stratified by fasting glucose level // *Diabetes Care.* – 2019. – Vol. 42, No. 3. – P. 457–465. DOI: 10.2337/dc18-1773
- Emerging Risk Factors Collaboration; Sarwar N., Gao P., Seshasai S.R., Gobin R., Kaptoge S., Di Angelantonio E., Ingelsson E., Lawlor D.A., Selvin E., Stampfer M., Stehouwer C.D., Lewington S., Pennells L., Thompson A., Sattar N., White I.R., Ray K.K., Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies // *Lancet.* – 2010. – Vol. 375, No. 9733. – P. 2215–2222. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60484-9. Erratum in: *Lancet.* – 2010. – Vol. 376, No. 9745. – P. 958.
- Gaede P., Lund-Andersen H., Parving H.H., Pedersen O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes // *N Engl J Med.* – 2008. – Vol. 358, No. 6. – P. 580–591. DOI: 10.1056/NEJMoa0706245
- Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group // *Lancet.* 1998. – Vol. 352, No. 9131. – P. 837–853. Erratum in: *Lancet.* – 1999. – Vol. 354, No. 9178. – P. 602.
- Raghavan S., Vassy J.L., Ho Y.L., Song R.J., Gagnon D.R., Cho K., Wilson P.W.F., Phillips L.S. Diabetes mellitus-related all-cause and cardiovascular mortality in a national cohort of adults // *J Am Heart Assoc.* – 2019. – Vol. 8, No. 4. – P. e011295. DOI: 10.1161/JAHA.118.011295
- Svensson E., Baggesen L.M., Johnsen S.P., Pedersen L., Nørrelund H., Buhl E.S., Haase C.L., Thomsen R.W. Early glycemic control and magnitude of hba1c reduction predict cardiovascular events and mortality: population-based cohort study of 24,752 metformin initiators // *Diabetes Care.* – 2017. – Vol. 40, No. 6. – P. 800–807. DOI: 10.2337/dc16-2271
- Mannucci E., Dicembrini I., Lauria A., Pozzilli P. Is glucose control important for prevention of cardiovascular disease in diabetes? // *Diabetes Care.* – 2013. – Vol. 36, Suppl 2. – P. S259–S263. DOI: 10.2337/dcS13-2018
- ElSayed N.A., Aleppo G., Aroda V.R., Bannuru R.R., Brown F.M., Bruemmer D., Collins B.S., Hilliard M.E., Isaacs D., Johnson E.L., Kahan S., Khunti K., Leon J., Lyons S.K., Perry M.L., Prahalad P., Pratley R.E., Seley J.J., Stanton R.C., Gabbay R.A., on behalf of the American Diabetes Association. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes-2023 // *Diabetes Care.* – 2023. – Vol. 46, Suppl 1. – P. S140–S157. DOI: 10.2337/dc23-S009
- Knudsen L.B., Lau J. The discovery and development of liraglutide and semaglutide // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2019. – Vol. 10. – Art. ID: 155. DOI: 10.3389/fendo.2019.00155
- Kristensen S.L., Rørth R., Jhund P.S., Docherty K.F., Sattar N., Preiss D., Køber L., Petrie M.C., McMurray J.J.V. Cardiovascular, mortality, and kidney outcomes with GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2019. – Vol. 7, No. 10. – P. 776–785. DOI: 10.1016/S2213-8587(19)30249-9. Erratum in: *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2020. – Vol. 8, No. 3. – P. e2.
- Yu M., Benjamin M.M., Srinivasan S., Morin E.E., Shishatskaya E.I., Schwendeman S.P., Schwendeman A. Battle of GLP-1 delivery technologies // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2018. – Vol. 130. – P. 113–130. DOI: 10.1016/j.addr.2018.07.009
- Hussein H., Zaccardi F., Khunti K., Davies M.J., Patsko E., Dhalwani N.N., Kloecker D.E., Ioannidou E., Gray L.J. Efficacy and tolerability of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors and glucagon-like peptide-1 receptor agonists: A systematic review and network meta-analysis // *Diabetes Obes Metab.* – 2020. – Vol. 22, No. 7. – P. 1035–1046. DOI: 10.1111/dom.14008
- Lyseng-Williamson K.A. Glucagon-like peptide-1 receptor analogues in type 2 diabetes: their use and differential features // *Clin Drug Investig.* – 2019. – Vol. 39, No. 8. – P. 805–819. DOI: 10.1007/s40261-019-00826-0. Erratum in: *Clin Drug Investig.* – 2019. Erratum in: *Clin Drug Investig.* – 2020. – Vol. 40, No. 3. – P. 291.
- Карпов Ю.А., Старостина Е.Г. Семаглутид (Оземпик) с точки зрения эндокринолога и кардиолога: возможности аналогов глюкагоноподобного пептида-1 далеко не исчерпаны // *Атмосфера. Новости кардиологии.* – 2019. – № 4. – С. 3–17. DOI: 10.24411/2076-4189-2019-12170
- Kapitza C., Nosek L., Jensen L., Hartvig H., Jensen C.B., Flint A. Semaglutide, a once-weekly human GLP-1 analog, does not reduce the bioavailability of the combined

- oral contraceptive, ethinylestradiol/levonorgestrel // *J Clin Pharmacol.* – 2015. – Vol. 55, No. 5. – P. 497–504. DOI: 10.1002/jcph.443
18. Kapitza C., Dahl K., Jacobsen J.B., Axelsen M.B., Flint A. Effects of semaglutide on beta cell function and glycaemic control in participants with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Diabetologia.* – 2017. – Vol. 60, No. 8. – P. 1390–1399. DOI: 10.1007/s00125-017-4289-0
19. Nauck M.A., Petrie J.R., Sesti G., Mannucci E., Courrèges J.P., Lindegaard M.L., Jensen C.B., Atkin S.L.; Study 1821 Investigators. A phase 2, randomized, dose-finding study of the novel once-weekly human GLP-1 analog, semaglutide, compared with placebo and open-label liraglutide in patients with type 2 diabetes // *Diabetes Care.* – 2016. – Vol. 39, No. 2. – P. 231–241. DOI: 10.2337/dc15-0165
20. Marbury T.C., Flint A., Jacobsen J.B., Derving Karsbøl J., Lassetter K. Pharmacokinetics and tolerability of a single dose of semaglutide, a human glucagon-like peptide-1 analog, in subjects with and without renal impairment // *Clin Pharmacokinet.* – 2017. – Vol. 56, No. 11. – P. 1381–1390. DOI: 10.1007/s40262-017-0528-2
21. Jensen L., Kupcova V., Arold G., Pettersson J., Hjerpsted J.B. Pharmacokinetics and tolerability of semaglutide in people with hepatic impairment // *Diabetes Obes Metab.* – 2018. – Vol. 20, No. 4. – P. 998–1005. DOI: 10.1111/dom.13186
22. Jensen L., Helleberg H., Roffel A., van Lier J.J., Bjørnsdottir I., Pedersen P.J., Rowe E., Derving Karsbøl J., Pedersen M.L. Absorption, metabolism and excretion of the GLP-1 analogue semaglutide in humans and nonclinical species // *Eur J Pharm Sci.* – 2017. – Vol. 104. – P. 31–41. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.03.020
23. Baekdal T.A., Thomsen M., Kupčová V., Hansen C.W., Anderson T.W. Pharmacokinetics, Safety, and tolerability of oral semaglutide in subjects with hepatic impairment // *J Clin Pharmacol.* – 2018. – Vol. 58, No. 10. – P. 1314–1323. DOI: 10.1002/jcph.1131
24. Blundell J., Finlayson G., Axelsen M., Flint A., Gibbons C., Kvist T., Hjerpsted J.B. Effects of once-weekly semaglutide on appetite, energy intake, control of eating, food preference and body weight in subjects with obesity // *Diabetes Obes Metab.* – 2017. – Vol. 19, No. 9. – P. 1242–1251. DOI: 10.1111/dom.12932
25. Johnson-Agbakwu C., Brown L., Yuan J., Kissling R., Greenblatt D.J. Effects of flibanserin on the pharmacokinetics of a combined ethinylestradiol/levonorgestrel oral contraceptive in healthy premenopausal women: a randomized crossover study // *Clin Ther.* – 2018. – Vol. 40, No. 1. – P. 64–73. DOI: 10.1016/j.clinthera.2017.08.021
26. Granhall C., Søndergaard F.L., Thomsen M., Anderson T.W. Pharmacokinetics, Safety and Tolerability of Oral Semaglutide in Subjects with Renal Impairment // *Clin Pharmacokinet.* – 2018. – Vol. 57, No. 12. – P. 1571–1580. DOI: 10.1007/s40262-018-0649-2
27. Sorli C., Harashima S.I., Tsoukas G.M., Unger J., Karsbøl J.D., Hansen T., Bain S.C. Efficacy and safety of once-weekly semaglutide monotherapy versus placebo in patients with type 2 diabetes (SUSTAIN 1): a double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, multinational, multicentre phase 3a trial // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2017. – Vol. 5, No. 4. – P. 251–260. DOI: 10.1016/S2213-8587(17)30013-X
28. Ahrén B., Masmiquel L., Kumar H., Sargin M., Karsbøl J.D., Jacobsen S.H., Chow F. Efficacy and safety of once-weekly semaglutide versus once-daily sitagliptin as an add-on to metformin, thiazolidinediones, or both, in patients with type 2 diabetes (SUSTAIN 2): a 56-week, double-blind, phase 3a, randomised trial // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2017. – Vol. 5, No. 5. – P. 341–354. DOI: 10.1016/S2213-8587(17)30092-X
29. Ahmann A.J., Capehorn M., Charpentier G., Dotta F., Henkel E., Lingvay I., Holst A.G., Annett M.P., Aroda V.R. Efficacy and safety of once-weekly semaglutide versus exenatide ER in subjects with type 2 diabetes (SUSTAIN 3): a 56-week, open-label, randomized clinical trial // *Diabetes Care.* – 2018. – Vol. 41, No. 2. – P. 258–266. DOI: 10.2337/dc17-0417
30. Aroda V.R., Bain S.C., Cariou B., Piletič M., Rose L., Axelsen M., Rowe E., DeVries J.H. Efficacy and safety of once-weekly semaglutide versus once-daily insulin glargine as add-on to metformin (with or without sulfonylureas) in insulin-naïve patients with type 2 diabetes (SUSTAIN 4): a randomised, open-label, parallel-group, multicentre, multinational, phase 3a trial // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2017. – Vol. 5, No. 5. – P. 355–366. DOI: 10.1016/S2213-8587(17)30085-2
31. Rodbard H.W., Lingvay I., Reed J., de la Rosa R., Rose L., Sugimoto D., Araki E., Chu P.L., Wijayasinghe N., Norwood P. Semaglutide added to basal insulin in type 2 diabetes (SUSTAIN 5): a randomized, controlled trial // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2018. – Vol. 103, No. 6. – P. 2291–2301. DOI: 10.1210/je.2018-00070
32. Pratley R.E., Aroda V.R., Lingvay I., Lüdemann J., Andreassen C., Navarria A., Viljoen A.; SUSTAIN 7 investigators. Semaglutide versus dulaglutide once weekly in patients with type 2 diabetes (SUSTAIN 7): a randomised, open-label, phase 3b trial // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2018. – Vol. 6, No. 4. – P. 275–286. DOI: 10.1016/S2213-8587(18)30024-X
33. Napoli R., Berra C., Catarig A.M., Di Loreto C., Donatiello E., Berentzen T.L., Pitocco D., Giorgino F. Once-weekly semaglutide use in patients with type 2 diabetes: Real-world data from the SURE Italy observational study // *Diabetes Obes Metab.* – 2023. – Vol. 25, No. 6. – P. 1658–1667. DOI: 10.1111/dom.15020
34. Wolffenbuttel B.H.R., Bruggs M.P., Catarig A.M., Clark A., Kok M., Lieveise A.G., van Soest J. Once-weekly semaglutide use in type 2 diabetes: real-world data from the SURE Netherlands observational study // *Adv Ther.* – 2023. – Vol. 40, No. 3. – P. 920–933. DOI: 10.1007/s12325-022-02385-x
35. Di Folco U., Vallecorsa N., Nardone M.R., Pantano A.L., Tubili C. Effects of semaglutide on cardiovascular risk factors and eating behaviors in type 2 diabetes // *Acta Diabetol.* – 2022. – Vol. 59, No. 10. – P. 1287–1294. DOI: 10.1007/s00592-022-01936-6
36. Witkowski M., Wilkinson L., Webb N., Weids A., Glah D., Vrazic H. A Systematic literature review and network meta-analysis comparing once-weekly semaglutide with other glp-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes previously receiving 1-2 oral anti-diabetic drugs // *Diabetes Ther.* – 2018. – Vol. 9, No. 3. – P. 1149–1167. DOI: 10.1007/s13300-018-0424-2

37. Kanters S., Wilkinson L., Vrazic H., Sharma R., Lopes S., Popoff E., Druyts E. Comparative efficacy of once-weekly semaglutide versus SGLT-2 inhibitors in patients inadequately controlled with one to two oral antidiabetic drugs: a systematic literature review and network meta-analysis // *BMJ Open*. – 2019. – Vol. 9, No. 7. – P. e023458. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-023458.
38. Hu S., Su X., Fan G. Efficacy and tolerability of the Subcutaneous Semaglutide for type 2 Diabetes patients: an updated systematic review and meta-analysis // *Diabetol Metab Syndr*. – 2023. – Vol. 15. – P. 218. DOI: 10.1186/s13098-023-01195-7
39. Romera I., Cebrián-Cuenca A., Álvarez-Guisasola F., Gomez-Peralta F., Reviriego J. A review of practical issues on the use of glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the management of type 2 diabetes // *Diabetes Ther*. – 2019. – Vol. 10, No. 1. – P. 5–19. DOI: 10.1007/s13300-018-0535-9
40. Leiter L.A., Bain S.C., Bhatt D.L., Buse J.B., Mazer C.D., Pratley R.E., Rasmussen S., Ripa M.S., Vrazic H., Verma S. The effect of glucagon-like peptide-1 receptor agonists liraglutide and semaglutide on cardiovascular and renal outcomes across baseline blood pressure categories: Analysis of the LEADER and SUSTAIN 6 trials // *Diabetes Obes Metab*. – 2020. – Vol. 22, No. 9. – P. 1690–1695. DOI: 10.1111/dom.14079
41. Husain M., Bain S.C., Holst A.G., Mark T., Rasmussen S., Lingvay I. Effects of semaglutide on risk of cardiovascular events across a continuum of cardiovascular risk: combined post hoc analysis of the SUSTAIN and PIONEER trials // *Cardiovasc Diabetol*. – 2020. – Vol. 19, No. 1. – P. 156. DOI: 10.1186/s12933-020-01106-4
42. Wilding J.P.H., Batterham R.L., Calanna S., Davies M., Van Gaal L.F., Lingvay I., McGowan B.M., Rosenstock J., Tran M.T.D., Wadden T.A., Wharton S., Yokote K., Zeuthen N., Kushner R.F.; STEP 1 Study Group. once-weekly semaglutide in adults with overweight or obesity // *N Engl J Med*. – 2021. – Vol. 384, No. 11. – P. 989–1002. DOI: 10.1056/NEJMoa2032183
43. Wadden T.A., Bailey T.S., Billings L.K., Davies M., Frias J.P., Koroleva A., Lingvay I., O'Neil P.M., Rubino D.M., Skovgaard D., Wallenstein S.O.R., Garvey W.T.; STEP 3 Investigators. Effect of subcutaneous semaglutide vs placebo as an adjunct to intensive behavioral therapy on body weight in adults with overweight or obesity: The STEP 3 Randomized Clinical Trial // *JAMA*. – 2021. – Vol. 325, No. 14. – P. 1403–1413. DOI: 10.1001/jama.2021.1831
44. Rubino D., Abrahamsson N., Davies M., Hesse D., Greenway F.L., Jensen C., Lingvay I., Mosenzon O., Rosenstock J., Rubio M.A., Rudofsky G., Tadayon S., Wadden T.A., Dicker D.; STEP 4 Investigators. Effect of continued weekly subcutaneous semaglutide vs placebo on weight loss maintenance in adults with overweight or obesity: The STEP 4 Randomized Clinical Trial // *JAMA*. – 2021. – Vol. 325, No. 14. – P. 1414–1425. DOI: 10.1001/jama.2021.3224
45. Rubino D.M., Greenway F.L., Khalid U., O'Neil P.M., Rosenstock J., Sørrig R., Wadden T.A., Wizert A., Garvey W.T.; STEP 8 Investigators. Effect of weekly subcutaneous semaglutide vs daily liraglutide on body weight in adults with overweight or obesity without diabetes: The STEP 8 Randomized Clinical Trial // *JAMA*. – 2022. – Vol. 327, No. 2. – P. 138–150. DOI: 10.1001/jama.2021.23619
46. Garvey W.T., Batterham R.L., Bhatta M., Buscemi S., Christensen L.N., Frias J.P., Jódar E., Kandler K., Rigas G., Wadden T.A., Wharton S.; STEP 5 Study Group. Two-year effects of semaglutide in adults with overweight or obesity: the STEP 5 trial // *Nat Med*. – 2022. – Vol. 28, No. 10. – P. 2083–2091. DOI: 10.1038/s41591-022-02026-4
47. Davies M., Færch L., Jeppesen O.K., Pakseresht A., Pedersen S.D., Perreault L., Rosenstock J., Shimomura I., Viljoen A., Wadden T.A., Lingvay I.; STEP 2 Study Group. Semaglutide 2.4 mg once a week in adults with overweight or obesity, and type 2 diabetes (STEP 2): a randomised, double-blind, double-dummy, placebo-controlled, phase 3 trial // *Lancet*. – 2021. – Vol. 397, No. 10278. – P. 971–984. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00213-0
48. Bandyopadhyay S., Das S., Samajdar S.S., Joshi S.R. Role of semaglutide in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease or non-alcoholic steatohepatitis: A systematic review and meta-analysis // *Diabetes Metab Syndr*. – 2023. – Vol. 17, No. 10. – P. 102849. DOI: 10.1016/j.dsx.2023.102849
49. Gumieniczek A., Berecka-Rycerz A. Metabolism and chemical degradation of new antidiabetic drugs: a review of analytical approaches for analysis of glitides and gliflozins // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11, No. 8. – P. 2127. DOI: 10.3390/biomedicines11082127
50. D'Hondt M., Bracke N., Taevernier L., Gevaert B., Verbeke F., Wynendaele E., De Spiegeleer B. Related impurities in peptide medicines // *J Pharm Biomed Anal*. – 2014. – Vol. 101. – P. 2–30. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.06.012
51. Li X., Fu Y., Zhang L., Yao L., Li W. Preparation method for semaglutide. WO2021143073A1, 2021.
52. Lester J., Lobo M., Chandrasekan C., Doshi S., Lalchand C., Nandlal G.Y., Nikhil U.M., Kodandaraman V. An improved process for fmoc synthesis of semaglutide. WO2023012709A1, 2023.
53. Zhang B., Xu W., Yin C., Tang Y. Characterization of low-level D-amino acid isomeric impurities of Semaglutide using liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry // *J Pharm Biomed Anal*. – 2023. – Vol. 224. – Art. ID: 115164. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.115164
54. Hong S.Y., Oh J.E., Lee K.H. Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide // *Biochem Pharmacol*. – 1999. – Vol. 58, No. 11. – P. 1775–1780. DOI: 10.1016/S0006-2952(99)00259-2
55. Гурова О.Ю., Фадеев В.В., Малолеткина Е.С. Инъекционная терапия при сахарном диабете 2 типа: существуют ли эффективные способы повышения приверженности лечению? // *Сахарный диабет*. – 2018. – Т. 21, № 6. – С. 524–533. DOI: 10.14341/DM9603

АВТОРЫ

Аметов Александр Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эндокринологии, заведующий сетевой кафедрой ЮНЕСКО по теме «Биоэтика сахарного

диабета как глобальная проблема», ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; заслуженный деятель науки РФ. ORCID ID: 0000-0002-7936-7619. E-mail: alexander.ametov@gmail.com

Шохин Игорь Евгеньевич – доктор фармацевтических наук, генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1185-8630. E-mail: i.shohin@cpha.ru

Рогожина Екатерина Алексеевна – соискатель кафедры биотехнологии и промышленной фармации, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет». ORCID ID: 0000-0002-3325-2605. E-mail: e.kate.rogozhina@gmail.com

Бодрова Татьяна Геннадьевна – соискатель научно-образовательного института фармации им. К.М. Лакина ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. ORCID ID: 0009-0001-0881-4880. E-mail: btatg@mail.ru

Невретдинова Мария Евгеньевна – врач-терапевт ООО «Практика здоровья». ORCID ID: 0000-0003-3008-4594. E-mail: mariamdoc@mail.ru

Белый Петр Александрович – кандидат медицинских наук, старший лаборант кафедры пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-5998-4874. E-mail: pbely@ncpharm.ru

Заславская Кира Яковлевна – ассистент кафедры биологической и фармацевтической химии с курсом организации и управления фармацией Медицинский институт ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-7348-9412. E-mail: kiryonok@yandex.ru

Щербакова Виктория Сергеевна – кандидат биологических наук, ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Тверского ГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7251-8744. E-mail: Victoria_kaptar@mail.ru

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, директор научно-образовательного института фармации им. К.М. Лакина ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: strannik986@mail.ru

Корянова Ксения Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-1571-9301. E-mail: kskor-16@mail.ru

Мищенко Екатерина Сергеевна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры токсикологической и аналитической химии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-7778-8391. E-mail: ekaterina-mischenko1809@mail.ru

Кесова Элина Юрьевна – студентка 6-го курса Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). ORCID ID: 0009-0005-0553-8365. E-mail: elkesova@icloud.com

Козлов Евгений Дмитриевич – старший преподаватель кафедры амбулаторно-поликлинической терапии медицинского института, ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0001-8373-6109. E-mail: dr.kozlov@yandex.ru

Самошкина Елена Семеновна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры педиатрии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-8192-7902. E-mail: esamoshkina@yandex.ru

Андреев Дмитрий Николаевич – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава РФ. ORCID ID: 0000-0002-4007-7112. E-mail: dna-mit8@mail.ru

Казаишвили Юрий Георгиевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Тверского ГМУ Минздрава РФ. ORCID ID: 0000-0003-0826-4177. E-mail: ykaza@bk.ru

Носков Сергей Михайлович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России; терапевт, главный исследователь ГБУЗ ЯО «КБ № 3», Ярославль, Россия. ORCID ID: 0000-0003-3456-9409. E-mail: Noskov03@gmail.com

Балыкова Лариса Александровна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой педиатрии, директор Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-2290-0013. E-mail: larisabalykova@yandex.ru

УДК 615:591.147.7:616.379-008.64



Физиология и фармакология рецептора глюкагоноподобного пептида-1

Д.В. Куркин^{1,2}, Д.А. Бакулин¹, Е.И. Морковин², В.И. Петров², А.В. Стрыгин², К.Н. Корянова³,
Ю.В. Горбунова¹, Ю.А. Колосов¹, О.В. Иванова¹, Е.В. Павлова¹, М.А. Джавахян¹,
А.В. Заборовский¹, В.Б. Сапарова¹, И.Е. Макаренко^{1,4}, Р.И. Драй⁴, А.Н. Чумаченко²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20/1

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

³ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532, Россия, г. Пятигорск, пр-кт Калинина, д. 11

⁴ Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг», 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34А

E-mail: strannik986@mail.ru

Получена 15.10.2023

После рецензирования 05.11.2023

Принята к печати 15.11.2023

Современные подходы к лечению сахарного диабета 2 типа (СД2) направлены не только на контроль гликемии, но и на снижение кардиоваскулярных рисков. Рост распространенности заболевания и необходимость в эффективных вариантах лечения подчеркивают важность агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) в структуре фармакотерапии.

Цель. Анализ литературы, касающейся физиологии ГПП-1, а также терапевтического потенциала и тенденций развития его агонистов.

Материалы и методы. Поиск материала для написания обзора проводили с использованием реферативных баз PubMed, Google Scholar и e-Library. Поиск осуществляли по публикациям в период с 2000 по 2023 годы, с использованием следующих ключевых слов: «ГПП-1»; «агонисты ГПП-1Р»; «ГИП»; «эксенатид»; «лираглутид»; «дулаглутид»; «семаглутид»; «ликсисенатид»; «албиглутид»; «таспоглутид» с учетом различных вариантов их написания.

Результаты. Взаимодействие практически всех компонентов пищи с энтероэндокринными клетками кишечника приводит к секреции в кровь инкретинов (прежде всего ГПП-1), запускающих комплекс физиологических реакций, направленных, в первую очередь, на быструю утилизацию поступающей глюкозы (регуляция секреции инсулина и глюкагона), а также центральную регуляцию пищевого поведения (замедление опорожнения желудка и формирование чувства насыщения). Широкое распространение рецептора к ГПП-1 в различных тканях и органах, его связь с внутриклеточными сигнальными каскадами, направленными на запуск энергетических процессов ремоделирования (восстановления) в клетках эндотелия, сердца, нейронах, бета-клетках и др., является основой для широкого спектра плейотропных эффектов ГПП-1, не связанных с его гипогликемическим действием. Открытие синтетических агонистов рецепторов ГПП-1 с длительным периодом действия дало возможность не только терапевтически воздействовать на различные звенья нарушений углеводного обмена, но и увеличить функциональные резервы органов-мишеней СД, снижая риск развития осложнений заболевания. Инкретиноподобные препараты хорошо переносятся, самым распространенным побочным эффектом является тошнота. Факторы, ограничивающие более широкое использование препаратов, включают высокую стоимость и преимущественную форму – раствор для подкожного введения. Текущие исследования связаны с разработкой препаратов с пролонгированным действием, пероральной формы, двойных и тройных агонистов, фиксированных комбинаций, а также препаратов малых молекул.

Заключение. Агонисты рецепторов ГПП-1 представляют собой класс эффективных и безопасных лекарственных средств для терапии СД и ожирения, который стремительно развивается по самым передовым направлениям фармации. Дальнейшее развитие этой группы и решение обозначенных задач откроет новые возможности для лечения СД и его осложнений.

Для цитирования: Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.И. Морковин, В.И. Петров, А.В. Стрыгин, К.Н. Корянова, Ю.В. Горбунова, Ю.А. Колосов, О.В. Иванова, Е.В. Павлова, М.А. Джавахян, А.В. Заборовский, В.Б. Сапарова, И.Е. Макаренко, Р.И. Драй, А.Н. Чумаченко. Физиология и фармакология рецептора глюкагоноподобного пептида-1. *Фармация и фармакология*. 2023;11(4):347-380. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-347-380

© Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.И. Морковин, В.И. Петров, А.В. Стрыгин, К.Н. Корянова, Ю.В. Горбунова, Ю.А. Колосов, О.В. Иванова, Е.В. Павлова, М.А. Джавахян, А.В. Заборовский, В.Б. Сапарова, И.Е. Макаренко, Р.И. Драй, А.Н. Чумаченко, 2023

For citation: D.V. Kurkin, D.A. Bakulin, E.I. Morkovin, V.I. Petrov, A.V. Strygin, K.N. Koryanova, Yu.V. Gorbunova, Yu.A. Kolosov, O.V. Ivanova, E.V. Pavlova, M.A. Dzhavahyan, A.V. Zaborovsky, V.B. Saparova, I.E. Makarenko, R.I. Drai, A.N. Chumachenko. Physiology and pharmacology of glucagon-like peptide-1 receptor. *Pharmacy & Pharmacology*. 2023;11(4):347-380. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-4-347-380

Ключевые слова: ГПП-1; агонисты глюкагоноподобного рецептора-1; сахарный диабет; инкретины

Список сокращений: ECD – внеклеточный N-концевой домен; FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США; FGF21 – фактор роста фибробластов 21; Gcg – препроглюкагон; GRP – гастрин-рилизинг пептид; NTS – ядро солитарного тракта; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PKA – протеинкиназа A; PKB – протеинкиназа B; PVN – паравентрикулярное ядро гипоталамуса; PYY – пептид YY; SGLT1 – натрий-глюкозный котранспортер 1 типа; TMD – трансмембранный домен; АТФ – аденозинтрифосфат; БА – болезнь Альцгеймера; БП – болезнь Паркинсона; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; ГИП – глюкозозависимый инсулиотропный полипептид; ГМ – головной мозг; ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид-1; ГПП-1Р – рецептор глюкагон-подобного пептида-1; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ДПП-4 – дипептидилпептидаза 4; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; СД2 – сахарный диабет 2-го типа; СЖК – свободные жирные кислоты; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; ЦНС – центральная нервная система.

Physiology and pharmacology of glucagon-like peptide-1 receptor

D.V. Kurkin^{1,2}, D.A. Bakulin¹, E.I. Morkovin², V.I. Petrov², A.V. Strygin², K.N. Koryanova³, Yu.V. Gorbunova¹, Yu.A. Kolosov¹, O.V. Ivanova¹, E.V. Pavlova¹, M.A. Dzhavahyan¹, A.V. Zaborovsky¹, V.B. Saparova¹, I.E. Makarenko^{1,4}, R.I. Drai⁴, A.N. Chumachenko²

¹ Russian University of Medicine,
Bld. 1, 20, Delegatskaya Str., Moscow, Russia, 127473

² Volgograd State Medical University,
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

³ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University,
11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

⁴ Closed joint-stock company “Farm-Holding”,
34A, Svyaz Str., Strelina Vil., St. Petersburg, Russia, 198515

E-mail: strannik986@mail.ru

Received 15 Oct 2023

After peer review 05 Nov 2023

Accepted 15 Nov 2023

Modern approaches to the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM) are aimed not only at glycemic control, but also at reducing cardiovascular risks. The increasing prevalence of the disease and the need for effective treatment options highlight the importance of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists in the pharmacotherapy structure.

The aim of the work was to review the literature regarding the physiology of GLP-1 and the therapeutic potential and development trends of its agonists.

Materials and methods. The search for the review materials was carried out using the abstract databases of PubMed, Google Scholar and e-Library. The search was carried out for publications from 2000 to 2023, using the following keywords: “GLP-1”; “GLP-1R agonists”; “GIP”; “exenatide”; “liraglutide”; “dulaglutide”; “semaglutide”; “lixisenatide”; “albiglutide”; “taspoglutide” taking into account various spellings.

Results. The interaction of almost all food components with enteroendocrine cells of the intestine leads to the secretion of incretins (primarily GLP-1) into the blood, triggering a complex of physiological reactions aimed primarily at the rapid utilization of incoming glucose (regulation of insulin and glucagon secretion), as well as the central regulation of dietary behavior (slowing gastric emptying and the formation of a feeling of satiety). A wide distribution of the GLP-1 receptor in various tissues and organs, its connection with intracellular signaling cascades aimed at launching energy-consuming remodeling (recovery) processes in endothelial cells, heart, neurons, beta cells, etc., is the basis for a wide range of pleiotropic effects of GLP-1 unrelated to its hypoglycemic effect. The discovery of synthetic GLP-1 receptor agonists with a long period of action has made it possible not only to therapeutically influence various parts of carbohydrate metabolism disorders, but also to increase the functional reserves of the target diabetes organs, reducing the risk of developing complications of the disease. Incretin-like drugs are well tolerated, with nausea being the most common side effect. The factors limiting a wider use of the drugs include their high cost and the preferred form of a subcutaneous solution. The current research is focused on the development of long-acting, oral, dual and triple agonists, fixed-dose combinations, and small molecule drugs.

Conclusion. GLP-1 receptor agonists are a class of effective and safe drugs for the treatment of diabetes and obesity, which is rapidly developing in the most advanced areas of pharmacy. A further development of this group and the solution of the identified problems will open up new opportunities for the treatment of diabetes and its complications.

Key words: GLP-1; glucagon-like receptor-1 agonists; diabetes mellitus; incretins

Abbreviations: ECD – extracellular N-terminal domain; FDA – U.S. Food and Drug Administration; FGF21 – fibroblast growth factor 21; Gcg – preproglucagon; GRP – gastrin releasing peptide; NTS – nucleus tractus solitarius; PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase; PKA – protein kinase A; PKB – protein kinase B; PVN – paraventricular nucleus of the hypothalamus; PYY – peptide YY; SGLT1 – sodium-glucose linked transporter 1; TMD – transmembrane domain; ATP – adenosine triphosphate; AD – Alzheimer’s Disease; PD – Parkinson’s Disease; GABA – gamma-aminobutyric acid; GIP – glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GM – genetically modified; GLP-1 – glucagon-like peptide-1; GLP-1R – glucagon-like peptide-1 receptor; BBB – blood-brain barrier; DPP-4 – dipeptidyl peptidase 4; GIT – gastrointestinal tract; T2DM – type 2 diabetes mellitus; FFA – free fatty acids; cAMP – cyclic adenosine monophosphate; CNS – central nervous system.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) является хроническим и прогрессирующим метаболическим нарушением, характеризующимся длительной гипергликемией, которая повышает риск развития макро- и микрососудистых осложнений. От 80 до 90% пациентов, на момент постановки диагноза СД2, имеют избыточную массу тела или ожирение, поэтому снижение массы тела и профилактика сердечно-сосудистого риска также являются ключевыми целями терапии СД2. При этом инсулин и широко используемые препараты из групп производных тиазолидиндиона и сульфонилмочевины способствуют увеличению массы тела. Агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1Р) являются инкретиномиметиками, они улучшают гликемический контроль и по многим параметрам превосходят гипогликемические препараты других групп. Агонисты ГПП-1Р рекомендованы в качестве одного из вариантов 2-й и 3-й линий комбинированной терапии прежде всего пациентам с ожирением и СД2, а некоторые (семаглутид и лираглутид) для снижения риска сердечно-сосудистых событий [1, 2].

Инкретиномиметики (агонисты ГПП-1Р и ингибиторы дипептидилпептидазы-4 – ДПП-4) хорошо переносятся и не вызывают гипогликемию, однако, в 2013 г. FDA (U.S. Food and Drug Administration) сообщило о повышенном риске возникновения панкреатита и предраковых клеточных изменений (метаплазии) протоков поджелудочной железы на фоне их применения. В то же время недавние мета-анализы показали, что частота острого панкреатита увеличивается на фоне приема ингибиторов ДПП-4, но не агонистов ГПП-1Р. Ингибирование ДПП-4 также влияет на элиминацию других субстратов, помимо глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1): глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (ГИП), некоторых цитокинов, факторов роста и нейропептидов. ДПП-4 (также именуемый CD26) также экспрессируется на поверхности Т-клеток. Таким образом, ингибиторы ДПП-4 способны оказывать действие на иммунную систему и воспаление, на что могут также иметь влияние генетические факторы [3].

Агонисты ГПП-1Р в настоящее время являются препаратами, эффективность и безопасность которых подтверждена многими клиническими исследованиями. Хотя они обладают целым рядом преимуществ перед гипогликемическими средствами других групп, ряд особенностей ограничивает их широкое использование: природа, способ производства и, очевидно, недостаточная информированность врачей и пациентов о современных противодиабетических лекарственных средствах.

ЦЕЛЬ. Провести поиск и анализ литературы, касающейся физиологии глюкагоноподобного пептида-1, а также терапевтического потенциала и тенденций развития агонистов его рецепторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск литературы (обзоры литературы, результаты экспериментальных и клинических исследований) осуществляли с помощью реферативных баз PubMed, Google Scholar и e-Library. Глубина поиска составила 23 года – с 2000 по 2023 г. Список ключевых слов включал (но не ограничивался) в различных сочетаниях и вариантах написания: ГПП-1 (GLP-1); агонисты ГПП-1Р (GLP-1R agonists); ГИП (GIP); эксенатид (exenatide); лираглутид (liraglutide); дулаглутид (dulaglutide); семаглутид (semaglutide); ликсисенатид (lixisenatide); албиглутид (albiglutide); таспоглутид (taspoglutide). Критериями исключения были более ранние публикации и статьи, не затрагивающие напрямую тему работы. Было проанализировано 410 источников и после систематизации удалены статьи со схожей информацией. После проверки 120 источников были признаны пригодными для включения в обзор.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Открытие гормонов семейства препроглюкагона

Временная шкала основных событий, связанных с исследованием ГПП-1, представлена на рисунке 1.

В начале XX века при применении инсулина, полученного из экстрактов поджелудочной железы или в виде неочищенных препаратов, развитию гипогликемического эффекта предшествовало повышение уровня гликемии (пик через 20 минут), что поначалу связывали с плохой очисткой препарата. В 1902 году Эрнест Бейлисс и Уильям Старлинг идентифицировали вещество, вырабатываемое эпителиальными клетками двенадцатиперстной кишки при контакте с компонентами пищи. Данный компонент стимулировал поджелудочную железу к секреции панкреатического сока при попадании в кровь и был назван секретин. В 1906 году Бенджамин Мур обнаружил, что многократный пероральный приём гомогената слизистой оболочки кишечника свиньи снижает глюкозурию у пациентов с диабетом, а также высказал предположение о способности клеток кишечника выделять вещества, стимулирующие секрецию инсулина. В 1929 году Эдгард Зунц и Жан Лабарр из экстрактов кишечника провели выделение фракции, снижающей уровень гликемии при введении животным. Ее назвали инкретином, предполагая способность стимулировать секрецию инсулина. В 1923 году Чарльз Кимбалл и Джон Мурлин выделили фракцию поджелудочной железы, которая после испарения и восстановления в воде оказывала сильный гипергликемический эффект при введении кроликам и собакам. Вещество, входящее в состав фракции, было названо «глюкозы агонист» или «глюкагон». В 1965 году Эллис Самолс выдвинул гипотезу о возможной связи глюкагоноподобного материала кишечника, стимулирующего

секрецию инсулина с эффектом инкретина. Похожий на глюкагон материал, выделенный из кишечника, состоял из белков нескольких фракций и вызывал физиологические эффекты противоположные оказываемым глюкагоном, который выделяли из поджелудочной железы. Концентрация глюкагоноподобного материала в крови возрастала в ответ на поступление глюкозы в кишечник, но не изменялась при её внутривенном введении. Иммуноцитохимические исследования показали, что клетки кишечника, окрашенные антителами к глюкагону по морфологическим и ультраструктурным признакам, отличались от α -клеток поджелудочной железы и были названы – «L-клетки». Позже было высказано предположение о наличии крупной молекулы-предшественницы – проглюкагона, которая в процессе посттрансляционной модификации расщепляется на несколько фракций, различающихся размерами и биологическими функциями. Позже был идентифицирован 42-аминокислотный полипептид, способный подавлять перистальтику желудка и секрецию соляной кислоты, который был назван желудочным ингибиторным пептидом или глюкозозависимым инсулиноотропным полипептидом (ГИП). Он также глюкозозависимо усиливал секрецию инсулина, а его удаление из экстрактов кишечника снижало инкретиновый эффект приблизительно на 50% [4, 5].

Важным открытием в области фармакологии ГПП-1Р стало выделение эксендина-4 (эксенатида) Джоном Энгом в 1992 году. Его клиническое применение стало возможным только в 2005 году (AstraZeneca, Великобритания). В 2006 году компания Merck & Co (США) получили одобрение на клиническое применение ситаглиптина – первого ингибитора ДПП-4 несмотря на то, что эти ферменты были открыты еще в 1966 году. Всего через 1 год, в 2007 году, эта же компания зарегистрировала первое комбинированное лекарственное средство из группы инкретиномиметиков – препарат на основе ситаглиптина и метформина. В 2009 году на фармацевтическом рынке появился первый агонист ГПП-1Р с высокой степенью гомологии к белку человека – лираглутид. В 2011 году была зарегистрирована первая комбинация инкретиномиметика и лекарственного средства, не относящегося к гипогликемическим, – комбинация ситаглиптина и симвастатина. В 2014 году инкретиномиметики стали впервые регистрировать по показаниям, не связанным с СД2: лираглутид был зарегистрирован в качестве препарата для лечения ожирения. В 2019 году компания Novo Nordisk вывела на рынок первый агонист ГПП-1Р для перорального применения – семаглутид [4–6].

Экспрессия гормонов семейства проглюкагона

Препроглюкагон (Gcg) экспрессируется в α -, β -клетках поджелудочной железы, в

энтероэндокринных L-клетках и в головном мозге (ГМ) [7, 8]. Специфические ферменты – прогормон-конвертазы, взаимодействуя с сайтами расщепления в молекуле Gcg, определяют то, какие молекулы пептидов / гормонов из него образуются: глицентин (АК 1–69), связанный с ним панкреатический полипептид (GRPP; АК 1–30); глюкагон (АК 33–61); оксинтомодулин (ОХМ; АК 33–69); основной фрагмент проглюкагона (MPGF; АК 72–158) и глюкагоноподобные пептиды 1 (ГПП-1; АК 72–107/108) и 2 (ГПП-2; АК 126–158) [9, 10]. Эти фрагменты проглюкагона значительно влияют на системный метаболизм, осуществляя модуляцию приема пищи и насыщения (ГПП-1, глюкагон, оксинтомодулин), поддерживают гомеостаз жидкости (потребление воды и диурез, ГПП-1) [8, 11], термогенез (глюкагон), метаболизм липидов (ГПП-1, глюкагон, ГПП-2), перистальтику ЖКТ (глюкагон, ГПП-1, ГПП-2) и опорожнение желудка (глюкагон, ГПП-1, ГПП-2). Глюкагон и ГПП-1, образуясь из одного предшественника Gcg, секретируются разными клетками и оказывают разнонаправленные эффекты в отношении концентраций глюкозы в крови. Это достигается клеточно-специфическими процессами, определяющими различную экспрессию и расщепление проглюкагона на фрагменты ферментами из группы конвертаз, а именно прогормон конвертаза 1 (PC1 или PCSK1 или PC1/3) или 2 (PC2 или PCSK2). PC1 экспрессируется в клетках ГМ и кишечника, участвуя в образовании ГПП-1, ГПП-2, глицентина, оксинтомодулина и промежуточного пептида IP2. PC2 экспрессируется в поджелудочной железе и определяет образование глюкагона, панкреатического полипептида (GRPP), основного фрагмента проглюкагона (MPGF) и промежуточного пептида (IP1) [4, 12].

Распределение (экспрессия) этих ферментов в тканях достаточно консервативна в физиологических условиях, но при гипергликемии может изменяться. В частности, активность и/или экспрессия PC1 в α -клетках (или изолированных островков) обнаруживается при культивировании в среде с высокой концентрацией глюкозы [13], что также приводит к повышению уровня ГПП-1. Повышение экспрессии PCSK1 в α -клетках приводит к увеличению продукции и секреции ГПП-1, инсулина и выживаемости островков [14]. Отмечено, что у мышей нокаутных по рецептору глюкагона уровень ГПП-1 в α -клетках выше, поэтому такие животные меньше чувствительны к токсическому действию стрептозотоцина [15]. Результаты исследований позволяют предположить наличие важной роли у α -клеток в компенсации высокой функциональной активности β -клеток при инсулинорезистентности, беременности и клеточном стрессе посредством модуляции продукции ГПП-1 внутри островка. В некоторых исследованиях отмечается, что для поддержания адекватного функционирования островкового аппарата важна коммуникация α - и

β -клеток, а глюкагон, основной пептид, производное проглюкагона (proglucagon-derived peptides, PGDP), являясь также агонистом ГПП-1Р стимулирует секрецию инсулина, действуя на β -клетки [12]. В островках, выделенных из мышей со специфичной для β -клеток делецией рецептора к глюкагону GcgR (GcgR^{βcell-/-}), стимуляция секреции инсулина глюкагоном сохраняется, но ослабляется при их обработке антагонистом ГПП-1Р – эксендином (9-39), а в островках, выделенных у мышей, нокаутных по ГПП-1Р, глюкагонзависимая секреция инсулина снижена [4, 16].

ГПП-1, ГПП-2, глюкагон, ГИП, секретин и соматолиберин принадлежат к группе структурно родственных пептидов способных связываться со структурно схожими рецепторами семейства GPCR класса В. Рецепторы этого семейства названы на основе его единственного и уникального эндогенного лиганда (ГПП-1, ГПП-2, Gcg, ГИП и соматолиберин), но в физиологических условиях отсутствует значимая перекрестная реактивность между пептидными лигандами и рецепторами этого семейства [17]. Однако известно, что в поджелудочной железе глюкагон обладает физиологически релевантной перекрестной реактивностью в отношении ГПП-1Р с $EC_{50}=36,4\pm 0,22$ нмоль/л, но сродство ГПП-1 к рецептору глюкагона отсутствует. Можно предположить, что взаимодействие глюкагона с ГПП-1Р играет важную роль для секреции инсулина [4, 18].

Белки семейства ГПП-1 образуются путем процессинга из проглюкагона. Они различаются способностью усиливать секрецию инсулина и разделяются на ГПП-1 (1–37) (или 1–36амид), ГПП-1 (7–36 амид) («амидированный» ГПП-1) и ГПП-1 (7–37) («удлиненный глицином ГПП-1»). У людей почти весь циркулирующий ГПП-1 является одной из укороченных форм, ~ 80% соответствует ГПП-1 (7–36 амид) и ~ 20% – удлиненному глицином ГПП-1 (7–37). Относительное содержание ГПП-1 (7–36 амид), ГПП-1 (7–37) и ГПП-1 (1–37) различается у разных видов. В экстрактах кишечника и поджелудочной железы крысы обнаруживаются более длинная, и укороченная формы ГПП-1. ГПП-1 (7–36 амид) и ГПП-1 (7–37) одинаково эффективно стимулируют секрецию инсулина и С-пептида, превышая по активности ГПП-1 (1–37). ГПП-1 (7–36 амид) быстро метаболизируется до ГПП-1 (9–36 амид), который считается слабым частичным агонистом рецепторов ГПП-1, но по сравнению с исходной структурой его плазменная концентрация может быть в пять-десять раз выше [4, 19, 20].

Селективная экспрессия Gcg клеточного типа регулируется более чем дюжиной факторов транскрипции, которые избирательно связываются с цис-действующими элементами в промоторных и энхансерных областях Gcg, стимулируя или ингибируя

экспрессию Gcg. Помимо ряда гомеодоменных белков, экспрессия Gcg также стимулируется протеинкиназой А (РКА) в ответ на высокие уровни цАМФ. Инсулин стимулирует экспрессию Gcg в кишечнике и подавляет в α -клетках. Некоторые эффекторы пути Wnt усиливают экспрессию Gcg в кишечнике, но не в поджелудочной железе [4, 21].

Рецептор глюкагона и ГПП-1

Как правило, все эффекты эндогенного ГПП-1 реализуются через ГПП-1Р – трансмембранный рецептор, содержащий 463 аминокислоты, ассоциированный с G-белком (GPCR). Как и другие GPCR класса В, рецепторы ГПП-1 содержат внеклеточный N-концевой домен (ECD, extracellular N-terminal domain или NTD, N-terminal domain) из более чем 100 аминокислотных остатков, и трансмембранный домен (TMD), состоящий из семи спиралей, соединенных внеклеточными и внутриклеточными петлями. Внеклеточный N-концевой домен GPCRs семейства В содержит общую складку, стабилизированную тремя дисульфидными мостиками, которая имеет важное значение для обеспечения сродства связывания рецептора с пептидом-лигандом. ГПП-1 связывается как с внеклеточным N-концевым доменом (ECD), так и с внеклеточной половиной TMD. Исследование зависимости «структура – активность» при активации ГПП-1Р выявило обширное взаимодействие С-конца ГПП-1 с пептидсвязывающей бороздкой N-терминального внеклеточного домена (ECD) рецептора. Связывание ГПП-1 с ECD приближает N-конец пептида ГПП-1 к TMD, и их взаимодействие вызывает конформационные изменения в спиральном пучке, что делает возможным взаимодействие внутриклеточной половины TMD с G-белком. Ключевое инсулинотропное действие ГПП-1 через рецептор, связанный с G-белком класса В, проявляется за счет образования циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), повышения содержания Ca^{2+} , что способствует экзоцитозу инсулинсодержащих везикул [20, 22, 23]. Помимо клеток островков поджелудочной железы ГПП-1Р также экспрессируется в ГМ, почках, желудке, печени, скелетных мышцах и жировой ткани. В поджелудочной железе максимальный уровень экспрессии ГПП-1Р наблюдается в β -клетках, меньше в ацинарных клетках и минимальный в клетках протоков. Также этот рецептор был обнаружен в стенках артерий почек и легких, синусовом узле кардиомиоцитов (ограничена синоатриальным узлом), двенадцатиперстной кишке (в железе Бруннера). Низкая экспрессия ГПП-1Р отмечена в париетальных и гладкомышечных клетках желудка, в кишечном сплетении [4, 24, 25].

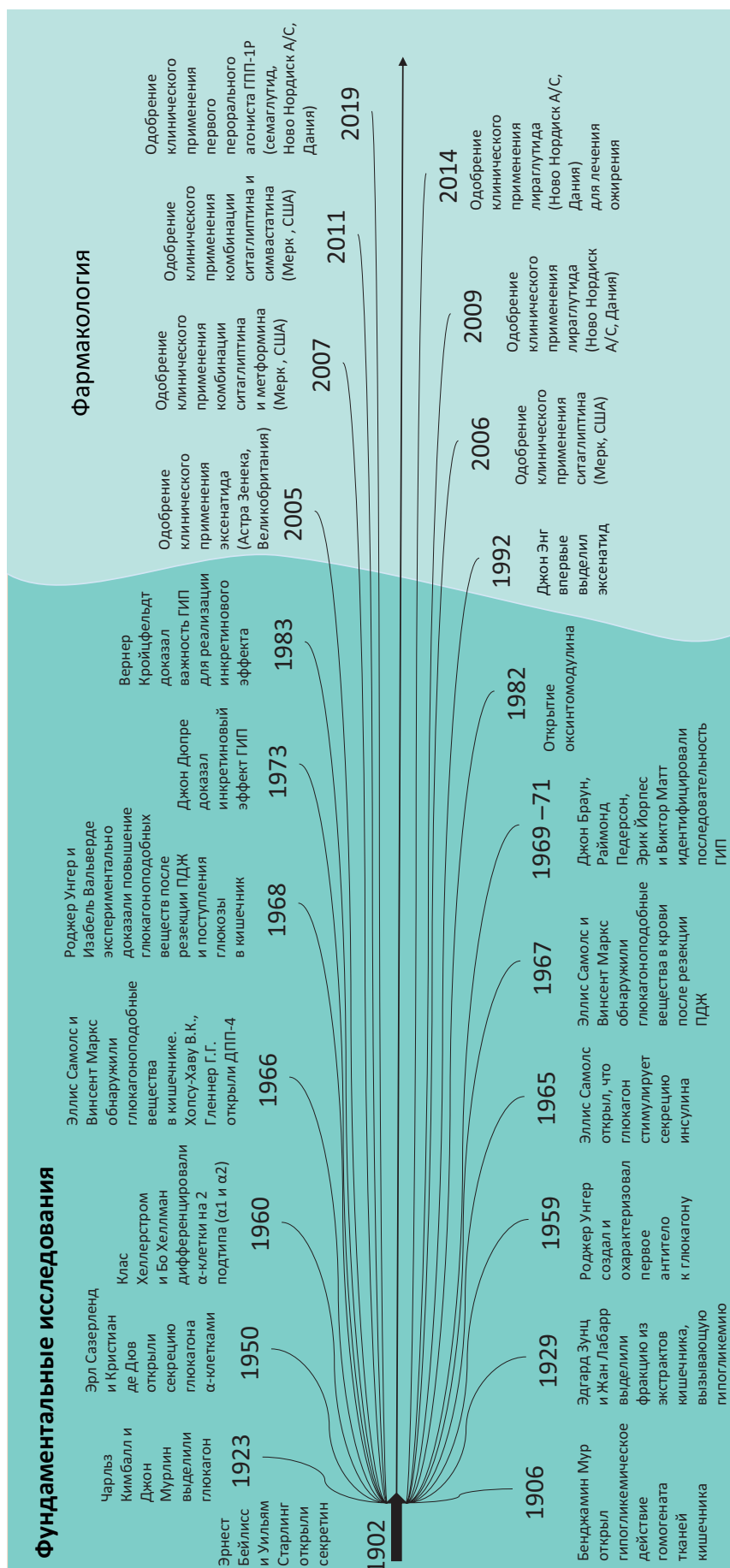


Рисунок 1 – Основные даты открытий связанных с разработкой агонистов ГПП-1Р

Примечание: ГИП – глюкозозависимый инсулиноототропный полипептид; ГПП-1Р – рецептор глюкагон-подобного пептида-1; ДПП-4 – дипептидилпептидаза 4; ПДЖ – поджелудочная железа.

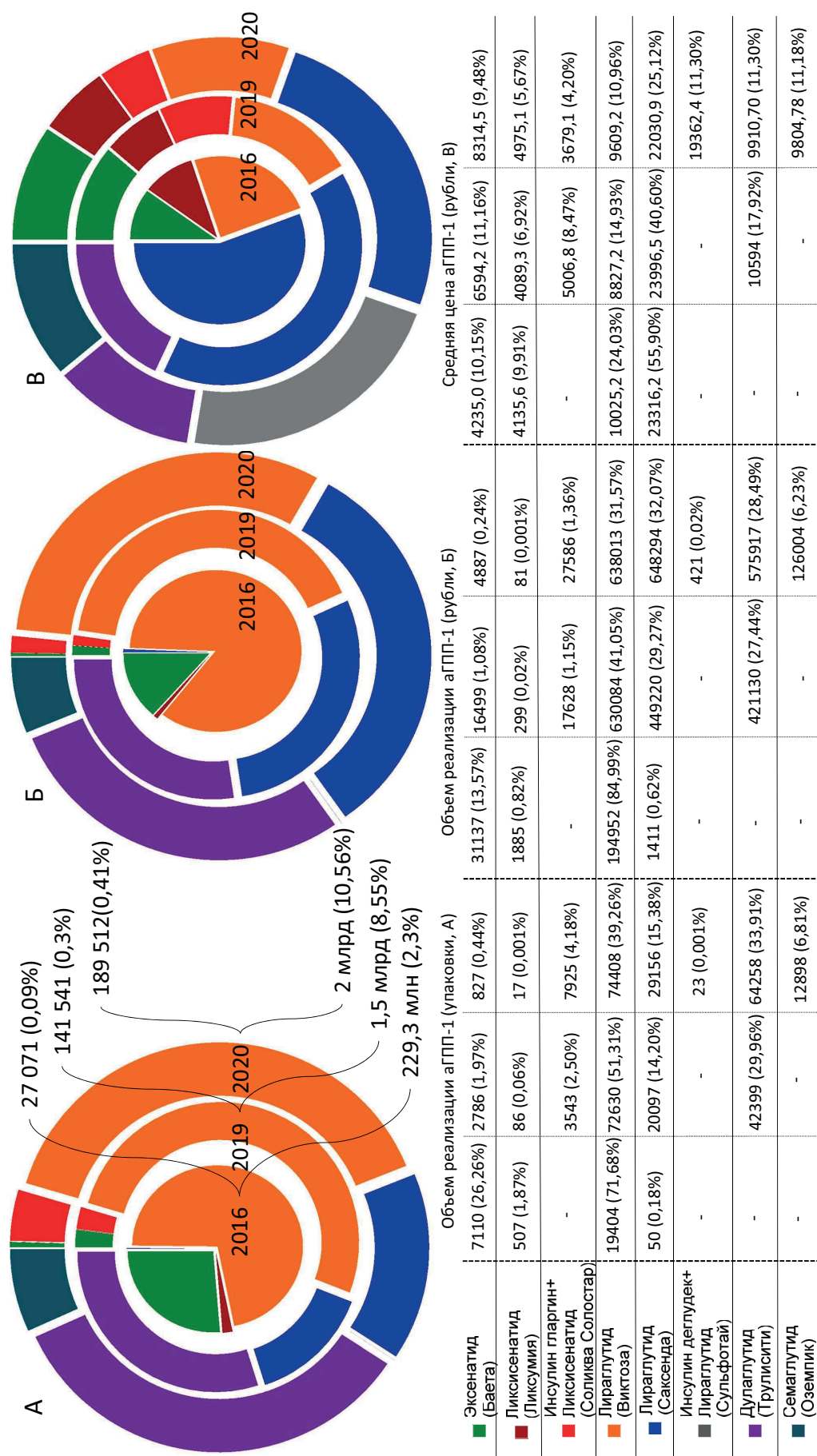


Рисунок 2 – Рынок агонистов ГПП-1Р на территории РФ

Примечание: данные были официально приобретены у компании DSM Group, на их основе произведены расчёты и представлены диаграммы; данные представлены в российских рублях. На 1 августа 2022 года 1 доллар США (USD) соответствовал 61,3 российским рублям (RUB).

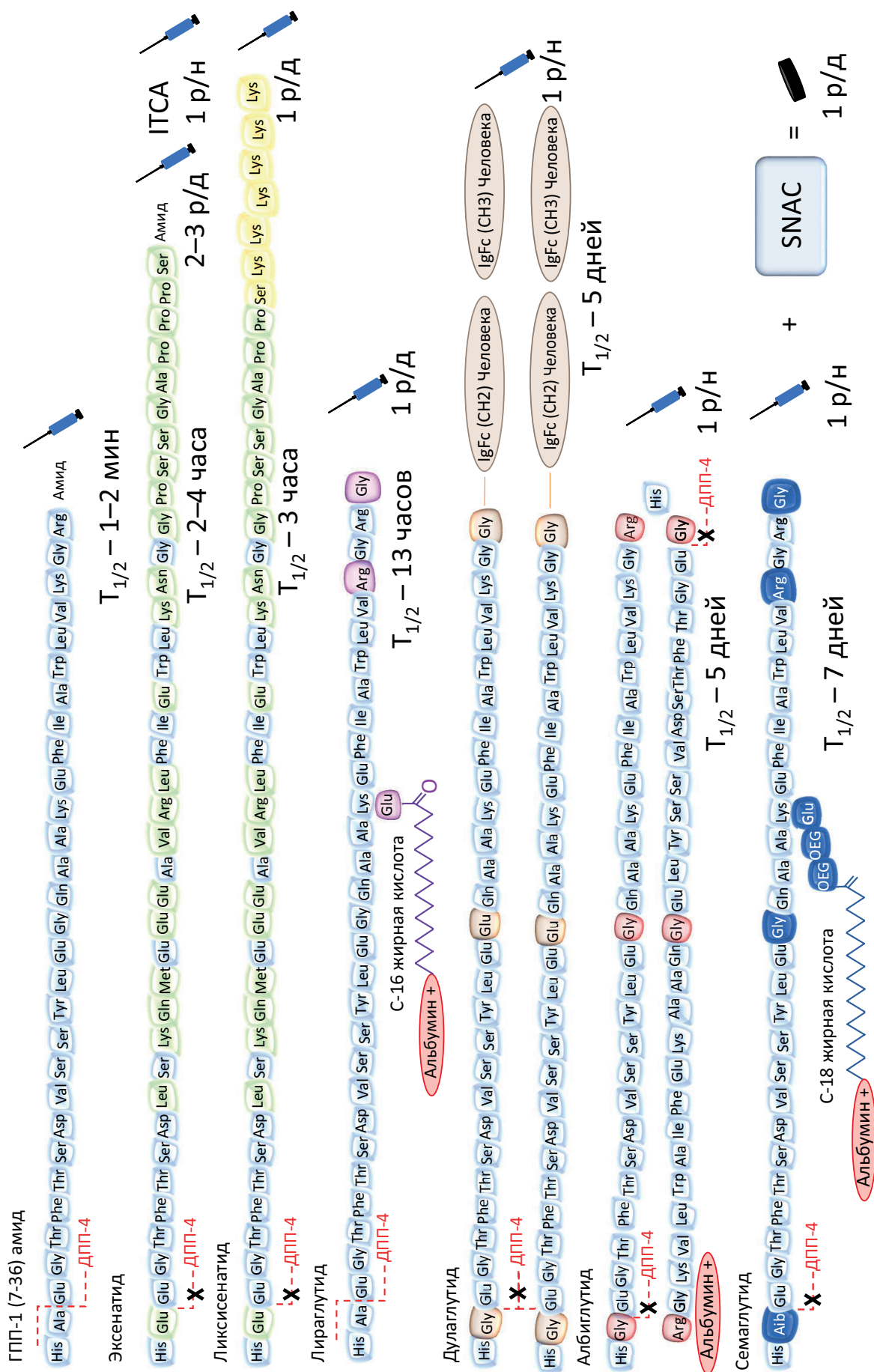


Рисунок 3 – Структура и особенности лекарственных препаратов на основе аналогов ГПП-1

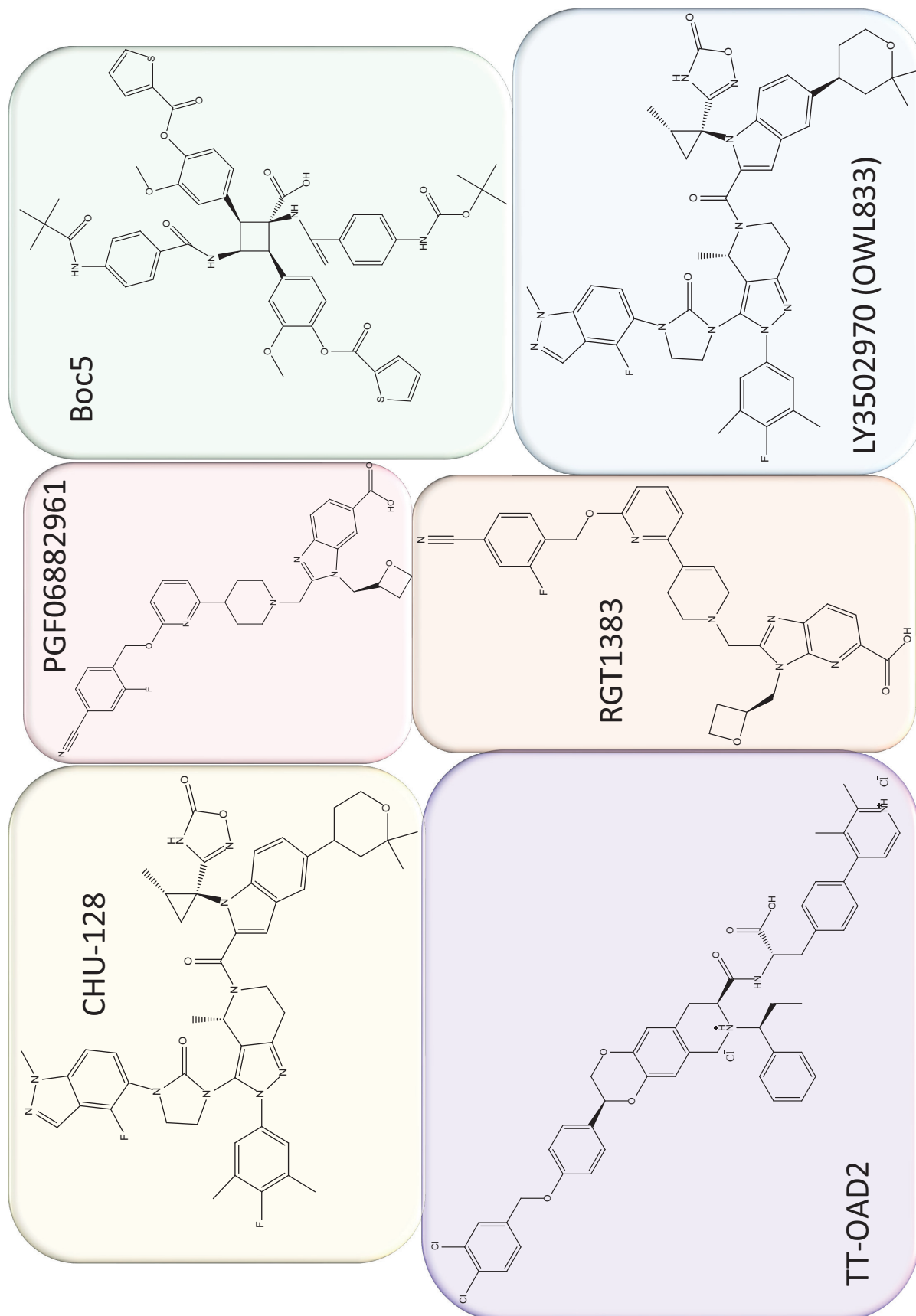


Рисунок 4 – Структуры непептидных агонистов ГПП-1Р

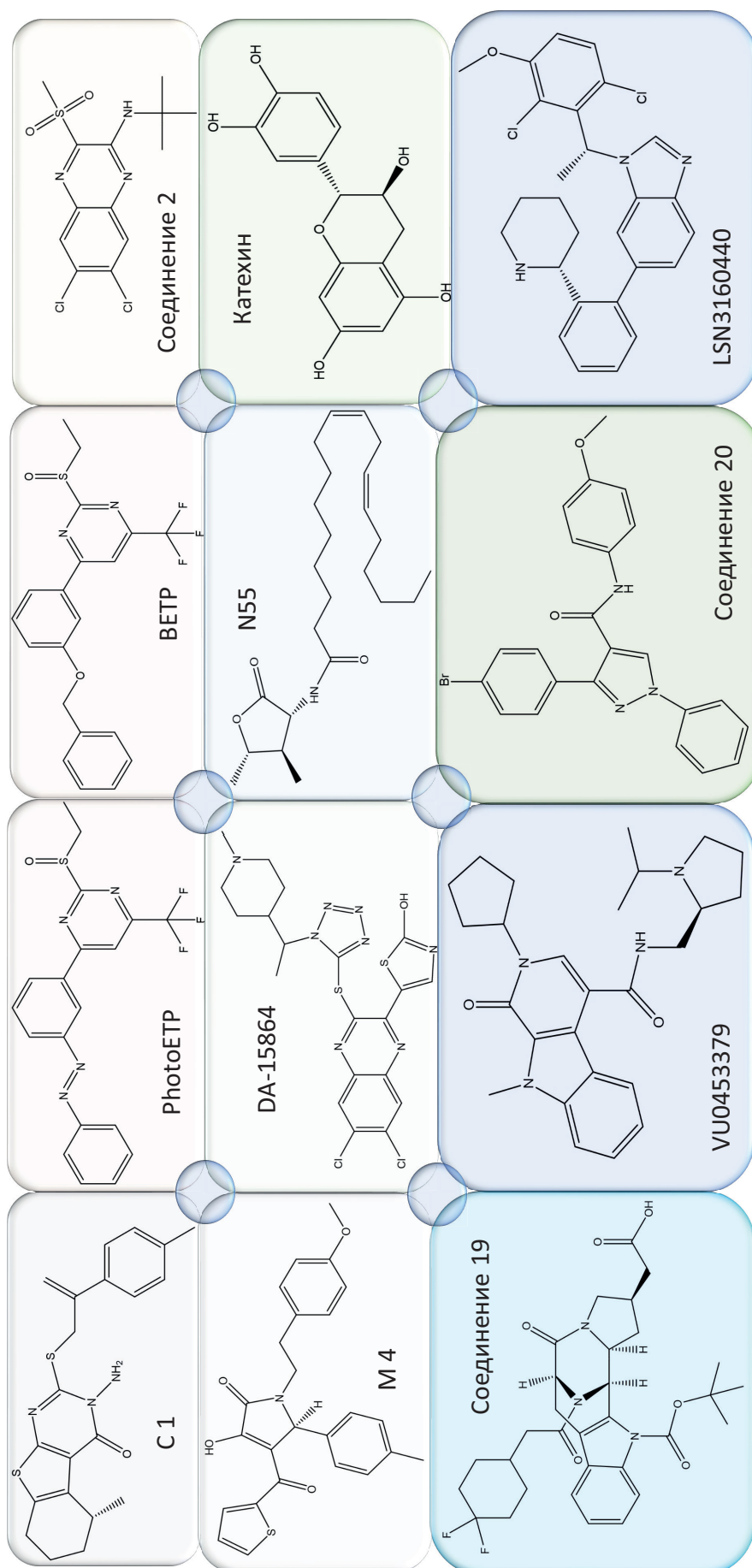


Рисунок 5 – Аллостерические модуляторы ГПП-1Р

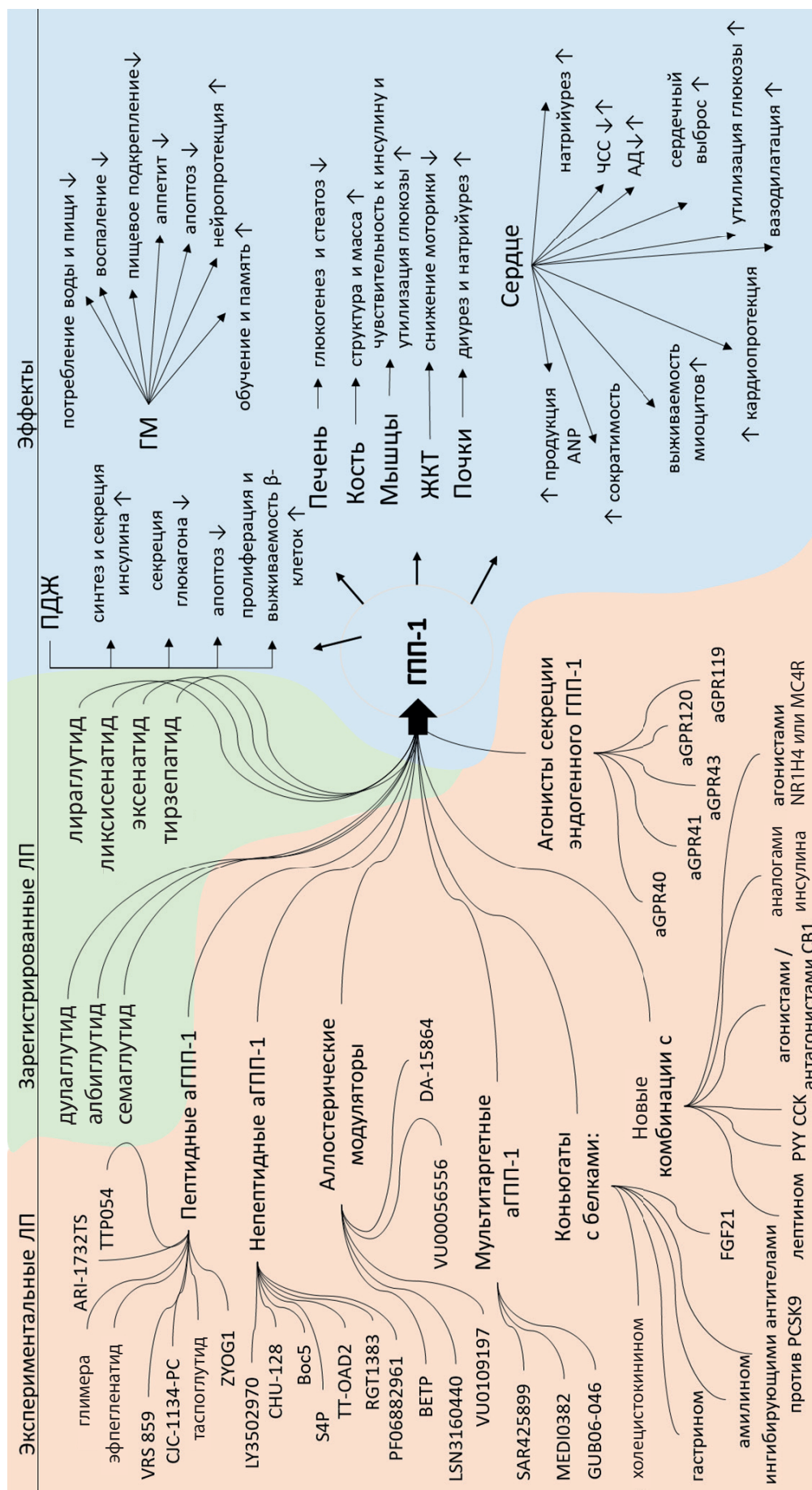


Рисунок 6 – Подходы к созданию агонистов ГПП-1Р и их эффекты

Примечание: АД – артериальное давление; аГПП-1 – агонист рецепторов глюкагоноподобного пептида-1; ГМ – головной мозг; ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид-1; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ЛП – лекарственный препарат; ПДЖ – поджелудочная железа; ЧСС – частота сердечных сокращений.

Таблица 1 – Локализация и функция рецепторов GPR40, GPR41, GPR43, GPR119, GPR120 [35, 36]

Рецептор	Локализация	Физиологический эффект при активации	Агонист
GPR40 (FFA1, FFAR1)	L- и K-клетки кишечника, бета-клетки поджелудочной железы	↑ секреции инкретинов и глюкозостимулированной секреции инсулина, улучшение регенеративных способностей и ↓ апоптоза бета-клеток	средне- и длинноцепочечные жирные кислоты, насыщенные и ненасыщенные (C10–C22)
GPR41 (FFA3, FFAR3)	L-клетки, моноциты, нейтрофилы, адипоциты, альфа- и бета-клетки	↑ секреции инкретинов и лептина, физиологические эффекты окончательно не изучены	короткоцепочечные жирные кислоты (C3=C4=C5>C2=C1)
GPR43 (FFA2, FFAR2)	L- и K-клетки, адипоциты, лейкоциты, альфа- и бета-клетки	↑ секреции инкретинов и лептина, ↓ перистальтики кишечника, ↑ секреции ГПП-1, ↓ активации лейкоцитов, ↓ липолитической активности в жировой ткани и ↓ плазменного уровня свободных жирных кислот физиологические эффекты окончательно не изучены	короткоцепочечные жирные кислоты (C2=C3>C4>C5=C1)
GPR119	L- и K-клетки, бета-клетки	↑ секреции инкретинов и глюкозостимулированной секреции инсулина, улучшение регенерации и ↓ апоптоза бета-клеток	производные амидов жирных кислот и фосфолипиды
GPR120 (FFA4, FFAR4)	L-клетки, адипоциты, макрофаги	↑ секреции инкретинов, ↑ захвата глюкозы адипоцитами и приобретение тканевыми макрофагами противовоспалительного фенотипа	средне- и длинноцепочечные насыщенные (C14–C18) и ненасыщенные (C16–C22) жирные кислоты

Исследования, выполненные на трансгенных животных с контролируемой экспрессией зеленого флуоресцентного белка (GFP), позволили установить экспрессию ГПП-1Р в β - и δ -клетках поджелудочной железы, гладких мышцах сосудов, предсердии, антральном отделе желудка, нейронах кишечника, ганглиях блуждающего нерва и задних корешках [25, 26].

Плотность экспрессии ГПП-1Р в разных органах может сильно отличаться у человека и животных. Например, С-клетки щитовидной железы у грызунов экспрессируют ГПП-1Р с очень высокой плотностью (более чем в 10 000 раз выше, чем у человека) и длительное введение агонистов ГПП-1Р грызунам вызывало выраженную пролиферацию С-клеток щитовидной железы и гиперсекрецию кальцитонина. По-видимому, у грызунов желудочно-кишечный стимул (гастрин, ГПП-1) необходим для нормальной секреции кальцитонина, тогда как у людей эта функция исчезла. В многочисленных клинических исследованиях не было отмечено повышения секреции кальцитонина и частоты развития С-клеточной карциномы во время терапии агонистами ГПП-1Р [19]. Однако маркировка некоторых препаратов, например тирзепатида (агонист рецепторов к ГИП и ГПП-1), содержит предупреждения о риске С-клеточной опухоли щитовидной железы у определенной категории пациентов.

Активация ГПП-1Р через G_s стимулирует синтез цАМФ, через путь $G_{q/11}$ увеличивает внутриклеточный

Ca^{2+} и посредством рекрутирования β -аррестина способствует активации сигнального пути ERK [27, 28]. Доказана лиганд-зависимая функциональная избирательность ГПП-1Р, приводящая к запуску определенных для различных лигандов путей передачи сигнала (относительно эндогенного гормона), вызывая разноплановые клеточные ответы. Это было выявлено при анализе образования цАМФ, накопления Ca^{2+} , рекрутирования β -аррестина и фосфорилирования ERK_{1/2}. Эксендин-4 (эксенатид) и окситомодулин, в отличие от ГПП-1, имеют смещение для передачи сигналов β -аррестина, который также способствует пролиферации и выживанию клеток по механизмам, включающим активацию ERK_{1/2} [27, 28]. Это свойство ГПП-1Р имеет важное значение, поскольку разные лиганды, модулируя определенные сигнальные пути, могут оказывать различный фармакологический эффект.

Секреция ГПП-1

L-клетки распределяются с возрастающим градиентом по длине ЖКТ, встречаясь с низкой частотой в двенадцатиперстной кишке (проксимально-дистальные нейрональные и/или гуморальные сигналы обеспечивая раннюю фазу секреции ГПП-1 во время еды), увеличиваясь в тощей, достигая максимума в подвздошной и толстой кишке. Иммунореактивные по ГПП-1 клетки также расположены в слизистой оболочке желудка, хотя и в небольшом количестве [7]. Апикальная поверхность L-клетки обращена в просвет кишечника и при

контакте с химусом (с липидами и углеводами) клетка секретирует ГПП-1 [25, 29]. Дистальные L-клетки могут играть важную роль замедлении продвижения химуса при достижении им подвздошной и толстой кишок при реализации механизма «подвздошный тормоз» (механизма отрицательной обратной связи для замедления кишечного транзита в ответ на повышенный уровень непереваренных питательных веществ в подвздошной кишке). Данное явление также воспроизводится при транспозиции в проксимальном направлении участка подвздошной кишки или при применении ингибиторов α -глюкозидазы, когда контакт большего числа L-клеток с непереваренными питательными веществами приводит к большей секреции ГПП-1 [7, 30].

Инкретины достаточно быстро расщепляются после секреции. В пределах кишечника разрушается 75% активного ГПП-1, в печени расщепляется половина проходящего ГПП-1 и только 10–15% активного ГПП-1 попадает в поджелудочную железу [31]. Плазменный уровень ГПП-1 натощак находится в диапазоне 5–10 пмоль/л и увеличивается после приема пищи до 15–50 пмоль/л (период полураспада для ГПП-1 составляет 2 мин). Уровень ГИП при этом изменяется от 20–30 до 300 пмоль/л после приема пищи, возвращаясь, как и у ГПП-1, к исходному уровню в течение 3 ч (период полураспада для ГИП составляет 5–7 мин) [32].

В воротной вене концентрация общего ГПП-1 достигает максимума примерно через 15 мин после внутрижелудочной инфузии жидкой пищи и возвращаются к исходным уровням через 90–120 мин. Существуют разногласия относительно того, нарушается ли индуцированная глюкозой секреция ГПП-1 у пациентов с СД2, так в клиническом исследовании было показано, что у пациентов с преддиабетом или СД2 ответ ГПП-1 на пероральную глюкозу снижен, но метаанализ 22 клинических исследований этого не подтвердил [33].

Белки, жиры и углеводы влияют на секрецию ГПП-1 через различные механизмы. Соответственно большее количество ГПП-1 высвобождается после приема смешанной пищи [26].

Влияние углеводов на секрецию ГПП-1

Клеточные механизмы стимуляции секреции ГПП-1 L-клетками глюкозой частично совпадают с механизмами, лежащими в основе секреции инсулина островками поджелудочной железы. Глюкоза и фруктоза дозозависимо увеличивают секрецию ГПП-1 энтероэндокринными клетками через универсальный механизм – закрытие АТФ-чувствительных K_{ATP} -каналов, что сопровождается деполяризацией мембраны, открытием потенциалзависимых каналов Ca^{2+} (VDC), увеличением притока Ca^{2+} и запуском везикулярного экзоцитоза с секрецией ГПП-1 в кровоток. Препараты

сульфонилмочевины, ингибируя активность K_{ATP} , повышают секрецию инсулина, но нет четких доказательств того, что они влияют на секрецию ГПП-1. Помимо описанного, глюкоза (даже в низких концентрациях) стимулирует электрическую активность L-клеток, способствуя секреции ГПП-1 посредством индукции малых внутренних токов, зависящих от натрий-глюкозного котранспортера (SGLT1). Сукралоза и другие подсластители не влияли на секрецию ГПП-1 в первичных культурах L-клеток и у людей [26, 30, 34].

Влияние липидов на секрецию ГПП-1

L-клетки, как и другие энтероэндокринные клетки, через специфические рецепторы реагируют со снижением эффективности (по мере перечисления) на следующие свободные жирные кислоты: α -линоленовая (C18:3), докозагексановая (C22:6), пальмитолеиновая (C16:1), олеиновая (C18:1), стеариновая (C18:0) и октановая (C8:0) кислоты. У человека насыщенные жирные кислоты менее эффективны, чем ненасыщенные. Индукция секреции ГПП-1 свободными жирными кислотами (СЖК или Free Fatty Acids – FFA) сильно зависит от концентрации Ca^{2+} в цитозоле. СЖК увеличивают секрецию ГПП-1, стимулируя приток внеклеточного Ca^{2+} через каналы Ca^{2+} на поверхности клетки [26, 35, 36].

Секреция ГПП-1 в ответ на СЖК опосредована рецепторами к длинноцепочечным СЖК – GPR40 (FFAR1) и GPR120 (FFAR4), короткоцепочечным СЖК – GPR41 (FFAR3) и GPR43 (FFAR2), а также к производным амидов жирных кислот и фосфолипидов – GPR119 [37, 38]. У животных, нокаутных по данным рецепторам, секреторный ответ ГПП-1 на СЖК значительно снижен, а применение агонистов к различным рецепторам (с различающимися вторичными мессенджерами) приводит к развитию синергетического эффекта в отношении секреции ГПП-1 [26, 27, 30].

Влияние аминокислот на секрецию ГПП-1

Секрецию ГПП-1 могут стимулировать белки, три-, дипептиды и аминокислоты. Это отмечалось в экспериментах на культурах первичных L-клеток толстой кишки мышей, в клетках GLUTag, изолированной перфузированной подвздошной кишке, а также *in vivo* у мышей, крыс и людей [26, 39]. Стимулирующим действием в отношении секреции ГПП-1 обладают глутамин, аспарагин, фенилаланин и глицин, причем глутамин и глицин являются наиболее активными. В исследованиях на клетках NCI-H716 было доказано стимулирующее на секрецию ГПП-1 действие лейцина, изолейцина, валина, обезжиренного молока, казеина и сыворотки. Высвобождение ГПП-1 стимулируется L-аргинином (также стимулятор секреции инсулина), что было продемонстрировано в экспериментах

на изолированном кишечнике крысы и при пероральном введении. Эти эффекты отсутствовали у мышей, нокаутных по ГПП-1Р [26, 30].

В основе стимуляции секреции ГПП-1 в ответ на белки или отдельные аминокислоты лежит активация Ca^{2+} кальмодулин-зависимой киназы II [26], т.е. опосредованная пептидами секреция ГПП-1 является процессом, чувствительным к Ca^{2+} , и включает передачу сигналов L-клеток через рецептор, чувствительный к Ca^{2+} (CaSR), и пептидный транспортер 1 (PEPT1). Стимуляция секреции ГПП-1 из очищенных культур мышинных L-клеток глицин-саркозином (Gly-Sar) блокируется в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} и ингибируется при обработке Ca^{2+} -каналов L-типа нифедипином. Олигопептидная стимуляция высвобождения ГПП-1 снижена в культуре L-клеток, обработанных антагонистом CaSR, и повышена у мышей, дефицитных по пептидному транспортеру 1 (PEPT1) [4, 26].

Влияние эндокринных стимулов на секрецию ГПП-1

Специфика распределения L-клеток в кишечнике свидетельствует о существовании проксимально-дистальной координирующей петли, в которой нейрональные и/или эндокринные факторы, возникающие в верхнем отделе кишечника, влияют на секрецию L-клетками ГПП-1 в дистальной области [7, 29]. Тем не менее, предполагаемый шунт (если он существует), вероятно, важен для ранней постпрандиальной фазы, когда L-клетки дистального отдела кишечника еще не находятся в прямом контакте с питательными веществами в его просвете. L-клетки находятся в непосредственной близости как к энтеральным нейронам, так и к микрососудам кишечника [7], что свидетельствует о возможной роли нейроэндокринного регулирования секреции ГПП-1. Наличие нейроэндокринной регуляции секреции ГПП-1 подтверждается результатами исследований на грызунах, у которых был исключен прямой контакт L-клеток в этой части кишечника с питательными веществами в его просвете. Введение таким грызунам глюкозы или жира в двенадцатиперстную кишку очень быстро вызывает секрецию L-клетками ГПП-1 на уровне сопоставимом с отмеченным при их введении в подвздошную кишку [7, 40].

Нейротрансмиттеры нейронов блуждающего нерва и кишечника (в том числе ацетилхолин и гастрин-релизинг пептид) увеличивают секрецию ГПП-1. Рецепторы ацетилхолина, включая мускариновые рецепторы M1, M2 и M3, экспрессируются в L-клетках крыс и клетках NCI-H716 человека. Неспецифический антагонист мускариновых рецепторов (атропин) или селективный антагонист M1 (пирензепин) подавляли индуцированную липидами секрецию ГПП-1 у крыс, что не было отмечено для M2 или M3-селективных

антагонистов [7]. В клетках NCI-H716 секреция ГПП-1 стимулируется бетанехолом (агонист M2), что блокируется при предварительной обработке пирензепином или галламином (антагонистом M2) [41]. Вместе эти данные указывают на участие мускариновых рецепторов M1 и M2 в секреции ГПП-1 L-клетками [4, 7].

В изолированной перфузированной подвздошной кишке свиньи секреция ГПП-1 ингибируется введением норадреналина. Этот эффект блокируется совместной инфузией неселективного антагониста α -адренергических рецепторов (фентоламина) [41]. Секреция ГПП-1 стимулируется агонистом β -адренорецепторов (изопrenalином) и этот эффект блокируется совместной инфузией антагониста β -адренорецепторов (пропранолола) [41]. Эти данные позволяют полагать, что секреция ГПП-1 в кишечнике стимулируется передачей сигналов холинергических и β -адренергических рецепторов, но ингибируется активацией α -адренорецепторов.

Гастрин-релизинг пептид (ГРП) продуцируется и высвобождается ГРП-ергическими нейронами нервной системы кишечника, а также стимулирует секрецию ГПП-1, что блокировалось введением антагониста ГРП (BW10). Способность ГРП повышать секрецию ГПП-1 была доказана на культурах L-клеток крыс и в препаратах подвздошной кишки крысы. На изолированной перфузируемой поджелудочной железе собаки было обнаружено, что ГРП также напрямую стимулирует секрецию инсулина и задерживает опорожнение желудка. У мышей с дефицитом ГРП были снижены толерантность к глюкозе, секреция инсулина в первой фазе и ГПП-1 в ответ на пероральное введение глюкозы [42].

Таким образом, секрецию ГПП-1 осуществляют L-клетки, расположенные в проксимальном отделе тонкой кишки после того, как химус только покидает привратник. Концентрация глюкозы после еды может превышать абсорбционную способность проксимального отдела кишечника, в итоге глюкоза быстрее достигает удаленных L-клеток. В регуляции секреции ГПП-1 могут участвовать нейроэндокринные рефлексы. Локальное увеличение ГИП стимулирует афферентную передачу блуждающего нерва с последующей активацией его эфферентных и нейронов кишечника, которые высвобождают ацетилхолин и/или ГРП, которые стимулируют секрецию ГПП-1 из дистального отдела [7].

Другие факторы, влияющие на секрецию ГПП-1, включают активацию обонятельного рецептора OR51E1 посредством нонановой кислоты, которая стимулирует секрецию ГПП-1 и PYY в L-клетках [43]. Грелин стимулирует секрецию ГПП-1 в культурах L-клеток. Периферическое введение грелина усиливает стимулируемую глюкозой секрецию ГПП-1, чего не наблюдается у нокаутных по ГПП-1Р мышей и что блокируется введением антагониста рецептора грелина (GHRP6) [40].

Эффекты ГПП-1

Инсулинотропные эффекты ГПП-1

Связывание ГПП-1 с его рецептором в β -клетках активирует аденилатциклазу, увеличивая концентрацию цАМФ и активируя PKA (фосфорилирует субъединицу SUR1 K-_{ATP}-каналов, сдвигая баланс в сторону их закрытия и деполяризации клеточной мембраны, что приводит к открытию потенциалзависимых каналов Ca^{2+} (VDC) и экзоцитозу гранул инсулина), а также усиливая передачу сигналов через обменные белки, непосредственно активируемые цАМФ (Ерас) [27, 34, 44]. До 50% секретируемого под влиянием ГПП-1 инсулина зависит от передачи сигналов через Ерас, члены (Ерас1 и Ерас2; экспрессируются в β -клетках) семейства которого содержат эволюционно консервативный домен связывания цАМФ, что позволяет им регулировать различные биологические функции зависимым от цАМФ образом. Белки Ерас стимулируют высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, повышая секрецию инсулина за счет увеличения пула внутриклеточного Ca^{2+} [27, 44]. При гипергликемии приток Ca^{2+} в β -клетки через каналы VDC значительно повышен; Ерас2 открывает каналы RYR Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме, дополнительно увеличивая внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} и, соответственно, экзоцитоз инсулина. Кальцийиндуцированное высвобождение кальция (CICR, calcium-induced calcium release), обуславливает зависимость инсулинотропного действия ГПП-1 от концентрации глюкозы. Поэтому в изолированной перфузируемой поджелудочной железе крысы, при концентрациях глюкозы <2,8 ммоль/л, ГПП-1 не может стимулировать высвобождение инсулина, что меняется при её повышении (>6,6 ммоль/л) [21, 34, 45]. Экзоцитоз инсулина, стимулируемый ГПП-1, частично подавляется ингибитором PKA (H89) и полностью блокируется комбинацией H89 с антисывороткой против Ерас2 (цАМФ-GEFII) [4, 45].

Помимо отчетливого влияния ГПП-1 на секрецию инсулина, ГПП-1Р, активируя PKA, стимулирует синтез инсулина β -клетками, что вероятно происходит за счет увеличения экспрессии Pdx1 (Insulin Promoter Factor 1, фактор промотора инсулина 1) [46].

Влияние ГПП-1 на пролиферацию и апоптоз β -клеток

По мере увеличения возраста, скорость репликации β -клеток снижается. В экспериментальных исследованиях было отмечено, что агонисты ГПП-1Р повышают массу β -клеток, стимулируя их пролиферацию и ингибируя апоптоз [6, 47, 48]. Агонисты ГПП-1Р, активируя транскрипционный фактор CREB, стимулируют экспрессию субстрата 2 рецептора инсулина

(Irs2, является субстратом инсулиноподобного фактора роста 1 и тирозинкиназ рецептора инсулина), что способствует росту и выживанию β -клеток. У мышей с дефицитом Irs2 [47] отмечены деструкция β -клеток и усиление их апоптоза, сопровождающееся выраженной гипергликемией, не устранявшейся даже при длительном введении эксендина-4, который, усиливая фосфорилирование CREB, улучшает функцию Irs2. Апоптоз β -клеток, вызванный стрептозотоцином, снижается при введении агонистов ГПП-1Р, которые уменьшали оксидативный стресс и увеличивали выживаемость β -клеток, стимулируя антиапоптотические сигнальные механизмы – PI3-киназозависимое фосфорилирование протеинкиназы В (PKB), ведущее к инактивации проапоптотического белка BAD и подавлению FoxO1 [44, 49, 50]. Таким образом, после активации ГПП-1Р в β -клетке запускаются множественные сигнальные пути, которые могут сохранить массу β -клеток в патологических условиях (активация PKA, PKB, CREB, экспрессия Pdx1 и Irs2, инактивации BAD и др.). Однако по мнению многих авторов больший терапевтический потенциал имеет ингибирование апоптоза, поскольку пролиферация β -клеток снижается с возрастом и менее выражена у людей, по сравнению с лабораторными животными [4, 44, 48, 51].

Влияние ГПП-1 на секрецию глюкагона

Рецептор к ГПП-1 присутствует только в 10% α -клеток поджелудочной железы [25] и большинство авторов склоняются к тому, что ГПП-1 ингибирует секрецию глюкагона не через ГПП-1Р, а посредством эндокринных механизмов. ГПП-1 стимулирует секрецию соматостатина, который через паракринные механизмы снижает выделение глюкагона. Данный эффект блокировался антагонистом рецептора соматостатина 2 (CYN154806) [21, 25]. Эффект ГПП-1 в отношении секреции глюкагона можно имитировать форсколин-индуцированным изменением цАМФ. Низкие концентрации форсколина (1–10 нмоль/л) подавляют секрецию глюкагона до 60%, в то время как высокие (0,1–10 мкмоль/л), наоборот, стимулируют. Ингибитор PKA (8-Br-Rp-cAMPS) ослабляет ингибирующий секрецию глюкагона эффект ГПП-1. Блокада Ca^{2+} -каналов N-типа ω -конотоксином, но не Ca^{2+} -каналов L-типа нифедипином, снижает стимуляцию секреции глюкагона глюкозой и притупляет эффекты ГПП-1. Таким образом, ГПП-1 может ингибировать секрецию глюкагона α -клетками посредством PKA-зависимой модуляции активности Ca^{2+} -канала N-типа в дополнение к паракринному действию соматостатина [52]. Помимо вышесказанного, ГПП-1 опосредованно подавляет секрецию глюкагона за счет инсулинотропного действия (повышает секрецию инсулина, амилина, цинка и ГАМК). Инсулин ингибирует высвобождение

глюкагона, активируя фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K). В α -клетках инсулин дополнительно усиливает транслокацию рецепторов ГАМК-А, а высвобождаемая из β -клеток она усиливает ингибирование секреции глюкагона глюкозой. Инсулин сокристаллизуется с Zn^{2+} в секреторных гранулах β -клеток и совместно секретруется с ним при гипергликемии и в данном случае Zn^{2+} играет важную роль в подавлении секреции глюкагона инсулином [4, 51].

Таким образом, ГПП-1 ингибирует секрецию глюкагона по нескольким механизмам, задействующим соматостатин, инсулин, Zn^{2+} , ГАМК и амилин. Значимое участие в этом процессе рецептора к ГПП-1 на α -клетках поддерживается не всеми авторами.

Сердечно-сосудистые эффекты ГПП-1

Экспрессия ГПП-1Р отмечена в сосудах, а также в предсердиях, желудочках, эндокарде, эндотелии и гладкомышечных клетках коронарных сосудов [25, 32]. Во многих исследованиях было выявлено кардиопротекторное действие агонистов ГПП-1Р, которое связывают с улучшением функции эндотелия и метаболизма миокарда, а также выживаемости кардиомиоцитов. При ишемически-реперфузионном повреждении миокарда цитопротективный эффект ГПП-1 ассоциируют с активацией ряда киназ RISK-пути (Reperfusion Injury Salvage Kinase / RISK / Pathway) – протеинкиназы А, фосфоинозитол-3-киназы (PI3K), протеинкиназы В и $ERK_{1/2}$, которые способствовали снижению проницаемости митохондриальной мембраны, защищая кардиомиоциты от апоптоза при реперфузионном поражении [53]. Некоторые исследователи связывают кардиопротективное действие с ГПП-1Р-опосредованной активацией транскрипционного фактора Nrf2 (ГПП-1Р / PKA(PKB) / CREB / Nrf2), регулирующего экспрессию генов антиоксидантных ферментов (глутатион-S-трансферазы, УДФ-глюкуронилтрансферазы, гемоксигеназы-1 и др.) [49]. Существует гипотеза о вазоактивной и кардиопротективной роли метаболита ГПП-1, которая поддерживается не всеми исследователями.

У здоровых добровольцев однократное введение ГПП-1, его метаболита или эксенатида не влияет на кровоток в брыжеечных или почечных артериях, но вызывает расширение сосудов брюшной полости и внутренних органов, что лежит в основе гипотензивного эффекта ГПП-1 [54]. Метаанализ 60 клинических исследований показал, что агонисты ГПП-1Р снижают диастолическое артериальное давление на 1,84–4,60 мм рт. ст. и увеличивают ЧСС на 2–3,35 уд./мин [55].

Механизмы, лежащие в основе влияния ГПП-1 на АД, до конца не изучены, но могут включать

вазодилатацию, вызванную секрецией оксида азота, способность стимулировать выделение мочи и натрия через почки [11, 19].

Влияние ГПП-1 на потребление пищи и массу тела

ГПП-1Р с высокой плотностью экспрессируется в лобной коре, гипоталамусе, таламусе, гиппокампе, миндалине, мозжечке и черной субстанции. Эти регионы являются ключевыми в центральной регуляции энергетического гомеостаза и автономных функций [56, 57].

В гипоталамусе рецептор в основном распределен в следующих ядрах: дугообразное или аркуатное (ARC, arcuate nucleus of the hypothalamus – связано с регуляцией аппетита), латеральное (LHA, Lateral Hypothalamic Area – центр голода), паравентрикулярное (PVN, Paraventricular Nucleus of Hypothalamus) – выделяет окситоцин, который подавляет аппетит поступая в вентромедиальное ядро (VMH, Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus – центр насыщения), а также соматостатин – замедляет моторику желудка, дорсомедиальное (DMH, Dorsomedial Hypothalamic Nucleus – регуляция АД и ЧСС) и супрахиазматическое (SCN, Suprachiasmatic Nucleus – циркадные ритмы) [8, 57, 58].

Рецептор обнаружен в дорсальном комплексе блуждающего нерва, в ядре солитарного тракта (NTS, Nucleus of the Solitary Tract) – одно из ядер продолговатого мозга, отростки его нейронов входят в состав лицевого, языкоглоточного и блуждающего нервов. NTS является местом входа чувствительных нервов от внутренних органов, служит переключателем вагусных рефлексов и благодаря взаимосвязям с гипоталамусом является звеном в формировании аппетита. Периферическое введение лептина, либо растяжение желудка активирует нейроны, продуцирующие ГПП-1 в NTS [21, 58].

С меньшей плотностью ГПП-1Р экспрессируется в околожелудочковых зонах: субфорникальный орган и *area postrema* (AP, «самое заднее поле», «хеморецепторная зона» ствола мозга, ответственная за осуществление рвотного рефлекса). В качестве нейрорептида ГПП-1 может регулировать многие вегетативные и нейроэндокринные функции. В эксперименте и в клинике показано, что ГПП-1, ингибируя активность блуждающего нерва, снижает подвижность желудка, секрецию желудочных желез и панкреатического сока [7, 57].

Центральная регуляция приема пищи агонистами ГПП-1 не ограничивается передачей сигналов ГПП-1Р в гипоталамус и задний мозг. ГПП-1 также влияет на питание, воздействуя на области мозга, участвующие в поощрении, мотивации и формировании зависимости, такие как вентральная область покрышки (Ventral Tegmental Area, VTA), прилежащее ядро (NAcc или Nac, *nucleus accumbens* – группа нейронов в вентральной части полосатого тела

(относится к базальным ядрам мозга), участвующая в процессах, связанных с вознаграждением, удовольствием, зависимостью, агрессией, страхом и эффектом плацебо)), боковая перегородка (LS, lateral septum – область мозга, соединяющая САЗ с вентральной тегментальной областью для связи сигналов вознаграждения с контекстом, в котором они возникают) [4, 57, 58].

Существуют различные мнения о способности эндогенного ГПП-1 преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). В исследованиях с использованием радиоактивно меченого ГПП-1 было установлено его быстрое поглощение ГМ через эндотелий, экспрессирующий ГПП-1P на своей поверхности. Другие авторы предполагают прохождение ГПП-1 в ткань ГМ в определенных зонах с неполным ГЭБ, а именно в зоне околожелудочковых органов ствола мозга, также известной своей большой плотностью рецепторов к ГПП-1. Аналогичная тропность наблюдалась у синтетических агонистов ГПП-1P (лираглутида и семаглутида). Интересно, что накопление агониста в этих местах (необходимое для визуализации) ниже у животных нокаутных по ГПП-1P. Таким образом, эти эксперименты также выявляют место первой активации рецептора агониста. Для агонистов ГПП-1P, представляющих собой большие молекулы (дулаглутид и албиглутид), предполагается низкая способность к прохождению через ГЭБ, что обуславливает менее выраженные центральные побочные эффекты и меньшее влияние на аппетит. При этом фенестры капилляров в островках поджелудочной железы кажутся достаточно широкими, чтобы обеспечить доступ к этим крупным молекулам [19, 59].

Мыши с глобальным дефицитом ГПП-1P имели нормальную массу тела, и у них не отмечали явных нарушений метаболизма при содержании на стандартной диете *ad libitum*, исключая умеренную гипергликемию при голодании и глюкозной нагрузке. При экспериментальной неспецифической блокаде ГПП-1P, специфической делеции или инактивации ГПП-1P в ЦНС (в том числе только в ядре солитарного тракта – NTS), а также ваготомии у ГПП-1 пропадало гипофагическое действие [7, 58, 60]. Напротив, прямое внутривенное введение подпороговых доз агонистов ГПП-1P в NTS, вентральную тегментальную область (VTA), паравентрикулярное ядро (PVN), латеральное ядро (LH), вентромедиальное ядро (VMH), дорсомедиальное (DMH) прилежащее ядро (NAcc), вентральный гиппокамп и боковую перегородку снижает потребление пищи, что блокируется антагонистом ГПП-1P эксендином (9–39) [58, 61]. Анорексигенный эффект лираглутида притупляется при генетическом удалении ГПП-1P из глутаматергических нейронов, но полностью сохраняется в условиях его удаления из ГАМК-ергических [62].

Введение агонистов ГПП-1P вызывают

активацию нейронов (измеряемую по активации cFos) в паравентрикулярном ядре (PVN), миндалине, *area postrema* (AP), ядре солитарного тракта (NTS), и аркуатном ядре (ARC) [7, 51]. Вызванная ГПП-1P активация нейронов сопровождается усилением фосфорилирования PKA и MAPK с соответствующим снижением активности AMPK (которая повышается при голодании, ингибировании гликолиза и стимулирует потребление пищи). При этом ингибирование активности PKA / MAPK введением Rp-cAMP или UO126 ослабляет эффекты агонистов ГПП-1P [56, 63].

Активация ГПП-1P подавляет различные виды поведения грызунов, которые связаны с вознаграждением – в тесте оперантного поведения, потребления и поиска алкоголя, предпочтения места (Amp-CPP), связанного с введением амфетамина. Этого не наблюдается у мышей с ЦНС-специфической делецией ГПП-1P [57, 64]. Активация ГПП-1P прилежащего ядра (NAcc) снижает потребление пищи за счет снижения вкусовых качеств пищи. Сытые крысы, которым предоставляли выбор между обычной или жирной пищей и вводили эксендин-4, предпочитали обычную пищу [60]. Инъекция эксендина (9–39) в NAcc увеличивает объем съеденной калорийной пищи и повышает частоту облизывания во время первого приема пищи, что является показателем сильной вкусовой привлекательности [51, 57, 58, 65]. Таким образом, агонизм ГПП-1P снижает гомеостатическое и гедоническое питание, и модулирует потребление пищи не только через гипоталамус и задний мозг, но также через передачу сигналов в мезолимбической системе, в которой активация ГПП-1P влияет на поведение, связанное с вознаграждением и восприятием вкуса.

Прямая электростимуляция ядра солитарного тракта (NTS) вызывает глутаматергические возбуждающие постсинаптические токи (EPSC) в Gcg⁺ положительных нейронах. Лептин вызывает быструю деполяризацию Gcg⁺ нейронов в NTS, что было обнаружено при определении напряжения и тока в цельных клетках горизонтальных или коронарных срезах ствола ГМ, что нарушает его способность напрямую стимулировать центральную секрецию ГПП-1. В Gcg⁺ нейронах заднего мозга нет ГПП-1P и они не могут напрямую активироваться ГПП-1. Введение PYY, меланотана II или грелина не стимулировало эти нейроны в изолированных срезах NTS мозга, но они отвечали на стимуляцию лептином, холецистокинином и адреналином [8, 66]. В NTS нейронах секретирующих ГПП-1 была обнаружена экспрессия рецептора лептина. Это может означать, что периферические эндокринные стимулы (например, лептин), подчиняясь этому механизму, могут запускать центральную активацию нейронов NTS, секретирующих ГПП-1.

Холецистокинин-индуцированная активация

нейронов NTS G_{cgs}^{+} блокируется антагонистом глутаматных рецепторов (DNQX) или ингибированием $\alpha 1$ -адренергической передачи сигналов [66], эти нейроны воспринимают различные периферические сигналы и, реагируя на них, регулируют энергетический баланс. Постоянная блокада ГПП-1Р в ЦНС или его вирусный нокдаун сопровождается увеличением массы тела крыс, а хомогенетическая стимуляция нейронов G_{cgs}^{+} наоборот вызвала снижение потребления пищи [67]. Острое хомогенетическое ингибирование этих нейронов не увеличивало потребление пищи, но повышало его после стресс-индуцированной гипофагии [68]. Таким образом, нейроны, продуцирующие глутаматергический ГПП-1 в NTS, активируются рядом периферических сигналов и регулируют многие аспекты пищевого поведения.

Влияние ГПП-1 на энергетический гомеостаз

Термогенез без дрожания требует наличия функциональной бурой жировой ткани, поэтому есть основания полагать, что ГПП-1Р вносит вклад в контроль расхода энергии путем регулирования активности бурой жировой ткани через рецепторы в ЦНС, поскольку он экспрессируется в ядрах ГМ, участвующих в контроле метаболизма бурой жировой ткани. Введение ГПП-1 в дорсомедиальное ядро гипоталамуса (DMH) повышало термогенез в бурой жировой ткани, а нарушение локальной экспрессии ГПП-1Р на нейронах DMH крыс приводило к увеличению массы тела, которое сопровождалось снижением выделения тепла бурой жировой тканью [58, 69].

Таким образом, ГПП-1Р ГМ участвуют в контроле расхода энергии, прежде всего регулируя потребление пищи, также регулируя расход энергии. Но исследования этих эффектов ГПП-1 ограничены ввиду низкой проникающей способности через ГЭБ и их отчетливом влиянии на аппетит и моторику ЖКТ, а также особенностями физиологии ГПП-1Р у грызунов.

Влияние ГПП-1 на опорожнение желудка

Активация ГПП-1Р приводит к снижению моторики желудка и секреции соляной кислоты, как при периферическом так и при центральном введении. Отмеченный эффект не воспроизводился у мышей нокаутных по ГПП-1Р, а также после ваготомии у людей, а блокирование рецептора к ГПП-1, напротив, приводило к ускорению опорожнения желудка [63]. Однако при длительном введении у агонистов ГПП-1Р снижается влияние на моторику желудка из-за развивающейся тахифилаксии [70].

Влияние ГПП-1 на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось

Нейроны ядра солитарного тракта (NTS) участвуют в регуляции гипоталамо-гипофизарно-

надпочечниковой оси в ответ на стресс, а передача сигналов ГПП-1Р в ГМ играет неотъемлемую роль в остром ответе ЦНС на стресс. Препроглюкагон-положительные нейроны NTS имеют плотные проекции в область PVN гипоталамуса, где они иннервируют нейроны, высвобождающие кортиколиберин [4, 51, 57, 58]. Также ГПП-1Р экспрессируется в нейронах PVN, которые локализируются совместно с кортиколиберином [71]. Введение ГПП-1 в ЦНС крысам и мышам активирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось и увеличивает секрецию кортикостерона. У грызунов и людей периферически вводимые агонисты ГПП-1Р временно стимулируют гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось и повышают концентрацию кортикостерона, альдостерона и АКПГ [59]. У мышей с PVN-селективной делецией ГПП-1Р нарушена вызванная стрессом активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, что предупреждает вызванную стрессом потерю веса, снижает реакции сердечно-сосудистой системы и выраженность тревоги [71]. Комбинированное введение дексаметазона и эксендина-4 приводит к большему анорексигенному эффекту и снижению массы тела, чем только агониста ГПП-1. Удаление катехоламинов в нейронах заднего мозга введением анти-дофамин- β -гидроксилаза-сапорин (DSAP), притупляет способность эксендина-4 повышать секрецию кортикостерона, но потенцируют гипофагический эффект эксендина-4.

Влияние ГПП-1 на обучение, память и нейропротекторные эффекты

Рецептор к ГПП-1 экспрессируется в гиппокампе – области ГМ, участвующей в пространственном обучении и памяти. Центральная агонизм ГПП-1Р улучшает некоторые аспекты обучения и памяти в водном лабиринте Морриса и увеличивают латентный период в тесте пассивного избегания. Улучшение обучения и памяти введением ГПП-1 блокируется предварительным введением эксендина (9–39) и отсутствует у мышей, дефицитных по рецептору ГПП-1 [72].

Центральная передача сигналов ГПП-1Р оказывает нейропротективное действие. ГПП-1 и эксендин-4 усиливают дифференцировку и рост нейритов в клетках феохромоцитомы крысы (PC12) и нейробластомы человека SK-N-SH. Эффект агонистов ГПП-1Р блокируется при совместной инкубации клеток PC12 с эксендином (9–39). ГПП-1 и эксендин-4 защищают культивируемые нейроны гиппокампа от апоптоза, индуцированного глутаматом [56, 73]. Время и тяжесть приступов, вызванных системным введением нейротоксина – каиновой кислоты – был выше у мышей, нокаутных по ГПП-1Р, по сравнению с особями дикого типа, и меньше у мышей, которым провели целевое восстановление экспрессии ГПП-1Р в гиппокампе

с использованием аденоассоциированного вируса (AAV).

Нейропротекторные эффекты центрального агонизма ГПП-1Р опосредованы способностью увеличивать образование цАМФ, усиливать активацию PI3-киназы и ERK. Агонизм ГПП-1Р увеличивает уровни цАМФ в культивируемых нейронах гиппокампа и клетках PC12. Фармакологическое ингибирование либо PI3-киназы, либо ERK блокирует стимулирующий эффект ГПП-1 и эксендина-4 в отношении роста аксонов в клетках PC12. В клетках PC12 стимуляция роста аксонов под действием ГПП-1 частично подавляется ингибитором PKA (H89), что указывает на наличие цАМФ-опосредованной активации PI3K и ERK после агонизма ГПП-1Р, и это не полностью зависит от передачи сигналов PKA [56].

Нарушение чувствительности к инсулину может быть причинным фактором нейродегенерации у пациентов с болезнью Хантингтона [74]. Сверхэкспрессия мутантного белка хантинтина нарушает передачу сигналов инсулина и стимулирует апоптоз нейронов в нейрональных клетках SK-N-MC человека, а лираглутид улучшает чувствительность к инсулину и увеличивает жизнеспособность таких клеток по механизмам включающим: уменьшение нейрональной глюкотоксичности, окислительного стресса и агрегации мутантного белка за счет стимуляции AMPK-опосредованной аутофагии [73, 74].

В модели нейродегенерации у крыс ГПП-1 и эксендин-4 уменьшали вызванное иботеновой кислотой истощение холинергических нейронов базального переднего мозга, что выражалось в большей сохранности иммунореактивности холина ацетилтрансферазы этих клеток. Введение агонистов ГПП-1Р в гиппокамп предупреждает нарушение обучения и памяти обусловленного введением амилоида β [75]. Агонисты ГПП-1Р, при введении мышам, снижают прогрессирование болезни Альцгеймера (БА) [76, 77]. При БА транспорт глюкозы через ГЭБ снижается, а 6-месячный прием лираглутида пациентами с БА в значительной степени нивелировало этот процесс [78]. В другом исследовании 12-недельное лечение лираглутидом пациентов с риском БА не влияло на когнитивные процессы, поскольку не было отмечено различий между когортами [79]. Клинические исследования нейропротекторных эффекты агонистов ГПП-1Р при БА продолжаются [80].

Аналоги ГПП-1 показали некоторую эффективность в лечении болезни Паркинсона (БП), которая характеризуется дегенерацией дофаминергических нейронов, что в эксперименте достигается введением дофаминергического нейротоксина МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин). У мышей, которым вводили этот токсин, 7-дневная инфузия эксендина-4 в боковой желудочек значительно снижала повреждение дофаминергической

системы и развитие двигательных нарушений [81]. Похожие нейропротекторные эффекты агонистов ГПП-1 отмечены в различных моделях БП [82]. В первичных культурах нейронов, обработанных дофаминергическим токсином 6-гидроксидофамином (6-OHDA), эксендин-4 увеличивал их выживаемость и уровни тирозингидроксилазы, ключевого фермента синтеза дофамина [81]. Несколько клинических исследований подтвердили способность агонистов ГПП-1Р улучшать клинические симптомы БП, а также двигательную и когнитивную функции [83].

Введение лираглутида или семаглутида на модели ишемически-реперфузионного поражения ГМ приводило к дозозависимому снижению размера инфаркта до 90% (соответственно и неврологического дефицита через 24 ч) после 90-минутной (умеренной по тяжести ишемии) окклюзии средней мозговой артерии. Однако предварительное введение антагониста ГПП-1Р эксендина (9–39) снижало защитный эффект препаратов, также нейропротективный эффект агонистов ГПП-1 значительно снижался при выборе более тяжелого варианта ишемии – в течение 120 или 180 мин [84].

Влияние ГПП-1 на потребление воды и функцию почек

У людей ГПП-1Р был идентифицирован в клетках проксимальных канальцев и прегломерулярных сосудах гладкомышечных клетках. ГПП-1 дозозависимо влияет на функцию почек, уменьшая потребление воды, а также стимулируя выделение мочи и натрия (стимуляция проксимального канальцевого натрийуреза) в течение короткого после его интрацеребровентрикулярного или внутрибрюшинного введения. При этом эффект был центрально-опосредованным и не зависел от приема пищи, блокировался эксендином (9–39). ГПП-1 вероятно индуцирует натрийурез и диурез за счет ингибирования натрий-водородного обменника 3 (NHE3), локализованного на щеточной кайме клеток проксимальных канальцев почек. Этот эффект может частично объяснить гипотензивное действие агонистов ГПП-1Р. Посредством модуляции передачи сигналов цАМФ / PKA ГПП-1 влияет на воспаление, включая почки и кровеносные сосуды, вероятно защищая почки от окислительного повреждения [11, 85].

В клинических исследованиях агонисты ГПП-1Р прежде всего способствовали снижению возникновения альбуминурии при отсутствии четких доказательств влияния на тяжелые почечные исходы [11, 19, 85].

Влияние ГПП-1 на костную ткань

Инкретины помимо гомеостаза глюкозы участвуют в регуляции энергетического процесса ремоделирования кости: ингибируют резорбцию

и стимулируют формирование костной ткани. На существование энтероэндокринно-костной оси указывают накопленные данные о влиянии на частоту остеопороза таких факторов как длительное парентеральное питание, бариатрические операции и наследственное нарушение функции ГИП [30, 86]. У животных, нокаутных по рецепторам к двум инкретинам ГИПР и ГПП-1Р наблюдалось снижение прочности костей и замедление синтеза коллагена [87].

Рецептор ГПП-1 экспрессируется в некоторых линиях остеобластных клеток человека (MG-63 и TE-85), что, однако, не отмечено для линии Saos-2. При этом ГПП-1 повышал жизнеспособность клеток MG-63 и TE-85. Нокаутные по рецептору ГПП-1 мыши страдают остеопенией и имеют повышенную хрупкость скелета. Лираглутид замедлял потерю костной массы у крыс с остеопорозом, вызванным глюкокортикоидами и у крыс с диабетом после овариэктомии. Нужно отметить, что в отличие от людей, у грызунов активация ГПП-1Р в С-клетках щитовидной железы способствует высвобождению кальцитонина, который ингибирует резорбцию кости. Это несколько снижает трансляционный потенциал результатов исследования агонистов ГПП-1Р, полученных на доклиническом этапе [86]. ГПП-2, который секретируется совместно с ГПП-1 также играет существенную роль в функционировании энтероэндокринно-костной оси. Рецептор к ГПП-2Р (ГПП-2Р) широко экспрессируется в остеокластах человека и может регулировать их активность. В клинических исследованиях было показано, что ГПП-2 снижал маркеры резорбции кости у здоровых женщин и женщин в постменопаузе [10, 86].

Больше всего данных в литературе о влиянии ГИП на ремоделирование костной ткани. Он дозозависимо снижал дифференцировку и костную резорбтивную активность мышиных и человеческих остеокластов, а также ингибировал индуцированное паратиреоидным гормоном увеличение резорбции кости. Также ГИП уменьшал апоптоз в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга человека и остеобластных клетках Saos-2. Введение ГИП здоровым людям приводило к снижению уровня С-телопептида коллагена I типа (CTX I) – маркера резорбции костной ткани и повышению уровня N-терминального пропептида проколлагена 1 типа (P1NP) – маркера формирования костного матрикса. Таким образом ГИП может оказывать анаболическое действие на кости в дополнение к ингибированию резорбции костной ткани [86].

ГИП и ГПП-2 являются ключевыми в энтероэндокринно-костной оси регуляторами постпрандиального костного ремоделирования у человека. Их совместное введение здоровым людям приводило к аддитивному снижению резорбции костей, превосходящему эффект каждого гормона

в отдельности. Разрабатываемые коагонисты рецепторов к ГИП и ГПП-2 рассматриваются как перспективный подход для лечения остеопороза [9], но опубликованные в настоящий момент результаты противоречивы. Таким образом, рецепторы ГИП / ГПП-1 / ГПП-2 могут стать перспективными фармакологическими мишенями для профилактики переломов у пациентов с остеопорозом и, возможно, также другими заболеваниями костей, например у больных СД [88].

Фармакология ГПП-1

В структуре фармацевтического рынка гипогликемических средств на территории РФ агонисты ГПП-1Р в 2016 году занимали 0,09% (27 071) в упаковках и 2,3% (229,3 млн) в рублях, а в 2019 и 2020 годах эти цифры были значительно выше 0,3% (141 541), 4,41% (189 512) и 8,55% (1,5 млрд), 10,56% (2 млрд) соответственно (Рис. 2А, Б). При этом стоимость таких лекарственных препаратов является самой высокой на рынке (Рис. 2В). Необходимо отметить, что в 2016 году на рынке присутствовало только 4 препарата – эксенатид (Баета®, Астра Зенека, Великобритания), ликсисенатид (Ликсумия®, Санофи, Франция), лираглутид (Виктоза® и Саксенда®, Ново Нордиск А/С, Дания), а в 2020 к ним добавились дулаглутид (Трулисити®, Илай Лилли энд Компани, Швейцария), семаглутид (Оземпик®, Ново Нордиск А/С, Дания) и комбинации с аналогами инсулина (дегludeк или гларгин). Учитывая представленные данные (Рис. 2), рынок гипогликемических лекарственных средств содержащих агонисты ГПП-1Р можно считать быстро развивающимся. В настоящее время модификация устойчивых к разрушению агонистов ГПП-1Р идет преимущественно в направлении улучшения параметров фармакокинетики.

Лекарственные препараты на основе агонистов ГПП-1Р

Эксенатид – синтетический пептид из 39 аминокислот (Рис. 3) (впервые обнаруженный как эксендин-4 в слюне Аризонского ядозуба (*Heloderma suspectum*), первые 30 из которых на 53% гомологичны ГПП-1 млекопитающих, имеет глицин во втором положении аминокислоты на N-конце, который защищает пептид от ДПП-4-опосредованной деградации и инактивации, также они различаются рядом аминокислот в центральном и C-концевом доменах, которые включают Leu10, Lys12, Gln13, Met14, Glu16, Glu17, Tyr19, Arg20, Leu21, Glu24, Lys27, Asn28 и Gly30. C-конец эксендина-4 больше ГПП-1 на 9 аминокислот, что поддерживает вторичную структуру за счет образования триптофановой клетки и повышает селективность в отношении ГПП-1Р [89–91]. Период полувыведения эксендина-4 у крыс составляет 18–41 мин после внутривенного,

125–174 мин после внутривенного и 90–216 мин после подкожного введения, его биодоступность выше чем у ГПП-1 (7–36 амид) и ГПП-1, клиренс из плазмы составляет 4–8 мл/мин. Режим применения составляет 2 раза в сут. В компании Amylin Pharmaceuticals разработана формула эксенатида для введения 1 раз в неделю под торговой маркой Bydureon® (AstraZeneca в продаже с 2012 года). В данном препарате эксенатид включен в состав микросфер с пролонгированным высвобождением, содержащий полимер поли (D, L-лактид-гликолид) 50:50 (37,2 мг на дозу) вместе с сахарозой (0,8 мг на дозу) [6, 90, 92].

На момент внедрения эксенатид был многообещающим средством для терапии СД2, существенным недостатком которого стала необходимость 2 ежедневных инъекций. Поэтому в компании Intarcia Therapeutics разработали устройство ITCA 650 – осмотическая мини-помпа размером со спичку (4×44 мм), подкожно имплантируемая в брюшную стенку и сроком до 6 мес, доставляющая в организм микродозы эксенатида. В 4 клинических исследованиях было показано значимое снижение уровня HbA1c и массы тела, однако в 2017 году FDA отказало в одобрении из-за проблем с производством [6, 90], а в 2021 году FDA повторно отказало в одобрении данного подхода из-за повышенного риска развития сосудистых осложнений СД на применения ITCA 650

VRS 859 (exenatide-XTEN, Versartis Inc., США) представляет собой объединенный протеин, с равномерной и стабильной абсорбцией, содержащий эксенатид и гидрофильный конец из 864 аминокислот (технология XTEN, Amunix Inc), что позволило увеличить период полувыведения с 2,4 до 139 ч у человека и теоретически должно привести к длительному гликемическому контролю [90]. Исследования этого соединения на мышах показали, что после внутривенного введения препарата в дозе 120 нмоль/кг толерантность к глюкозе сохраняется до 48 ч (после введения эксенатида аналогичное улучшение длится до 1 ч). Предполагается, что однократная подкожная доза 100 мг VRS-859 может обеспечить уровень препарата в плазме, достаточный для обеспечения гликемического контроля в течение 1 мес [92].

Эфпегленатид (HM11260C, Лангленатид, LAPS-Exendin, LAPS-Exd4). Эксендин-4 в этом препарате через не пептидный линкер сопряжен с негликозилированным фрагментом Fc человеческого иммуноглобулина (в отличие от дулаглутида, который имеет только один пептидный вариант, слитый с Fc-носителем) для снижения иммуногенного потенциала. Эфпегленатид имеет период полувыведения >150 ч, находится в рамках фазы II и III клинических испытаний (препарат для еженедельного или ежемесячного применения) [90].

В 20-недельном исследовании у пациентов с ожирением без диабета эфпегленатид (4, 6, 8 мг 1 раз в 7 или 14 дней) значительно снижал массу тела (6,2–7,8 кг по сравнению с плацебо – -0,8 кг), серьезные нежелательные явления не наблюдались [6, 51].

Альбенатид (CJC-1134-PC, ConjuChem, США) представляет собой эксендин-4 соединенный с С-концом рекомбинантного человеческого альбумина, образуя особый конъюгированный комплекс (Preformed Conjugate-Drug Affinity Complex, PC-DAC) через линкер с терминалом малеимида, который используется для химической конъюгации с одиночным цистеиновым остатком альбумина. У человека период полувыведения CJC-1134-PC составляет около 8 дней. Результаты клинических исследований еще не обнародованы [6, 31, 92].

Таким образом несмотря на то, что эксенатид был первым зарегистрированным препаратом из группы агонистов ГПП-1Р и его относительно небольшое сходство (в плане аминокислотной последовательности) с человеческим гормоном, он продолжает изучаться и модифицироваться, разрабатываются новые лекарственные формы / комбинации, пролонгирующие, упрощающие его применение и повышающие эффективность.

Ликсисенатид – аналог эксенатида, в котором пролин в положении 38 опущен, а к С-концу добавлены шесть последовательных остатков лизина, фармакокинетические характеристики сопоставимы с эксенатидом. Применяется 1 раз в сут, увеличение частоты приема не повышает эффективность контроля гипергликемии [6, 92]. В России зарегистрирована фиксированная комбинация раствор для подкожного введения ликсисенатид (33 и 50 мкг/мл)+инсулин гларгин (100 ЕД/мл).

Лираглутид создан на нативной последовательности ГПП-1 (7–37) с (консервативной) заменой лизина в положении 28 на аргинин. Аланин во втором положении от N-конца сохраняется, однако лизин в положении 20 связан через спейсер гамма-глутаминовой кислоты с пальмитиновой (C16:0), которая, связываясь с альбумином, делает препарат менее чувствительным к протеолизу ДПП-4. Лираглутид на 97% гомологичен ГПП-1. Модификация молекулы способствовала повышению биодоступности, а период полураспада увеличился до ~ 12 ч. Применяется 1 раз в сут в дозах 0,6–1,8 мг/сут, а в дозе 3 мг/сут лираглутид одобрен для лечения ожирения с 2014 года [92, 93].

Семаглутид является аналогом лираглутида, на 94% гомологичен ГПП-1. Чувствительный к ДПП-4 аланин во втором N-концевом положении в лираглутиде заменяется аминокислотой (Aib), а пальмитиновая (C16:0) жирная моноокислота в лираглутиде заменена на дикарбоновую стеариновую кислоту (C18:0). Эти

химические модификации продлевают период полувыведения семаглутида до 160 ч. Применяется 1 раз в неделю. Высокие дозы семаглутида проходят клинические исследования эффективности при ожирении без СД2. На основе семаглутида создан первый пероральный агонист ГПП-1Р – препарат Ребелсас® (Ново Нордиск А/С, Дания), эффекты которого сопоставимы с агонистами ГПП-1Р, вводимыми подкожно. Для облегчения всасывания в ЖКТ (повышения липофильности) и защиты пептидного препарата от ферментативного разрушения был использован усилитель абсорбции N-(8-[2-гидроксibenzoил]амино)каприлат натрия [89, 93].

Дулаглутид состоит из двух идентичных молекул ГПП-1, слитых дисульфидными связями и которые связаны полипептидной цепью (глицин и серин на основе спейсера) с фрагментом тяжелой цепи (Fc), модифицированного человеческого иммуноглобулина G4 (IgG4) для снижения иммуногенного потенциала. Фрагменты ГПП-1 дулаглутида на 90% гомологичны нативному (некоторые фрагменты нативного ГПП-1 заменены частями эксендина-4). Глицин во втором N-концевом положении защищает молекулу от инактивации ДПП-4, в то время как глутаминовая кислота в позиции 16 стабилизирует вторичную структуру и улучшает потенцию. Замена глицина в положении 30, наряду с нативным глицином на C-конце ГПП-1 (7–37), служит ведущей последовательностью для спейсера, который закрепляет Fc-фрагменты IgG4. Подобные модификации улучшают биодоступность, замедляют почечный клиренс и снижают иммуногенный потенциал. Применяется 1 раз в неделю [6, 92].

Альбиглутид представляет собой тандем «голова к хвосту» из двух молекул ГПП-1, в котором C-конец первой молекулы слит с N-концом второй. Каждая из двух молекул ГПП-1 имеет замену глицина в фрагментах, чувствительных к ДПП-4. C-конец второго ГПП-1 ковалентно слит с человеческим альбумином, что замедляет почечный клиренс, увеличивая период полувыведения до ~ 120 ч у людей [92]. Применяется 1 раз в неделю.

Таспоглутид (R1583/BIM51077; Hoffmann-La Roche, Швейцария) – длительно действующий аналог человеческого ГПП-1, содержащий аминокислотную кислоту, 10% (Aib 8-35) человеческого ГПП-1 (7–36 амидов) с гомологией к нативному полипептиду 93%. В исследовании фазы III он эффективно снижал HbA1c и массу тела при подкожном еженедельном введении в дозах 10 и 20 мг. Однако такие нежелательные реакции, как тошнота, рвота и аллергические проявления, возникали чаще, чем при приеме эксенатида в дозе 10 мкг 2 раза в сут. Разработка таспоглутида была прекращена в 2010 году [89].

Глимера (Glymera, PB1023, PhaseBio Pharmaceuticals, США) является рекомбинантным

аналогом ГПП-1, полипептидом, состоящим из 636 аминокислот, генетически слитым с физиологически инертным полимерным эластин-подобным пептидом *E. coli*, и вводится подкожно 1 раз в неделю (находится в фазе III клинических исследований). Эффективность введения еженедельных доз (50, 70 и 100 мг) сравнивались с лираглутидом один раз в день и плацебо в исследовании фазы IIb (600 больных СД2, 20 недель). Эффективность введения глимеры уступала лираглутиду [90].

Общими нежелательными реакциями на аналоги ГПП-1 являются тошнота, рвота и диарея. Эти эффекты дозозависимы, и в некоторых случаях воспринимаются, как потенциально полезные, поскольку снижают частоту приема пищи и её количество, тем самым способствуя снижению массы тела. По сравнению с аналогами ГПП-1 короткого действия (такими как эксенатид) пролонгированные реже вызывают тошноту и рвоту, но чаще – диарею [51].

Также в литературе имеется ограниченная информация о разрабатываемых пептидных агонистах ГПП-1Р ZYOG1 (Zyudus Cadila, Индия) и ARI-1732TS (Arisaph Pharmaceuticals, США), исследования которых находятся на соответственно 1 фазе и доклиническом этапе [90].

Согласно имеющейся в Государственном реестре лекарственных средств информации, в России зарегистрированы следующие агонисты ГПП-1Р и их комбинации – МНН (торговое наименование – наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения лекарственного препарата):

- эксенатид (Баета®, Астра Зенека, Великобритания);
- ликсисенатид+инсулин гларгин (Соликва Солостар®, Санофи Винтроп, Франция);
- лираглутид (Виктоза®/Саксенда® – Ново Нордиск А/С, Дания; Квинлиро® – АО «Биохимик», Россия; Энлигрия® – ООО «Промомед Рус», Россия);
- лираглутид+инсулин деглудек (Сультотай® – Ново Нордиск А/С, Дания);
- дулаглутид (Трулисити® – ООО «Свикс Хэлскеа», Россия);
- семаглутид раствор для подкожного введения; (Оземпик® – Ново Нордиск А/С, Дания; Квинсента® – ООО «Промомед Рус», Россия; Семавик® – ООО «ГЕРОФАРМ», Россия);
- семаглутид таблетки (Ребелсас® – Ново Нордиск А/С, Дания).

В рамках импортозамещения иностранных препаратов российскими аналогами агонисты ГПП-1Р представляют большой интерес для отечественных фармацевтических компаний. Особое внимание привлекает наиболее изученный препарат лираглутид, а также семаглутид – агонист ГПП-1Р с длительным периодом действия [94, 95]. При этом

для лираглутида с учетом относительно небольшого размера пептида и отсутствия у него третичной структуры рассматривается целесообразным производство АФС посредством химического синтеза, что оценивается как высокопроизводительный, масштабируемый и коммерчески жизнеспособный процесс, который может позволить получить продукт высокой чистоты. Результаты сравнительного исследования, полученного таким образом лираглутида (Энлигрия®, раствор для подкожного введения 6 мг/мл, ООО «Промомед РУС», Россия) показали аналогичные с оригинальным препаратом (Саксенда®, раствор для подкожного введения 6 мг/мл, Ново Нордиск А/С, Дания) физико-химические и биологические свойства [94].

Непептидные агонисты ГПП-1Р

Как было сказано ранее, активация ГПП-1Р эндогенным ГПП-1 требует обширного воздействия на рецепторный комплекс, включая взаимодействие С-конца ГПП-1 с пептидсвязывающей бороздкой N-терминального внеклеточного домена (ECD) рецептора, с последующим сближением и взаимодействием N-конца пептида ГПП-1 с трансмембранным доменом (TMD). Это делает возможным взаимодействие внутриклеточной половины TMD с G-белком, передачу сигнала и в итоге приводит к экзоцитозу инсулинсодержащих везикул. Имитация первоначальных множественных обширных взаимодействий с ECD и TMD рецептора ГПП-1 казалась нереализуемой для непептидных малых молекул, для которых, кроме того, предполагались различные особенности взаимодействий с рецепторным комплексом [20, 22, 23]. Однако в настоящий момент несколько непептидных агонистов находятся на этапе клинических исследований: PF 06882961 (Pfizer, США), TTP-273 (vTv Therapeutics/Huadong Medicine, Китай) и OWL-833 (Chugai / Eli Lilly, США), что указывает на значительные успехи в преодолении этой проблемы [96].

Для непептидных агонистов LY3502790, PF-06882961 и CHU-128 (Рис. 4) характерно специфичное взаимодействие с рецептором ГПП-1: активация сигнальной активности G-белка только в рецепторе ГПП-1 с Trp33 (ECD). Это было неожиданным открытием, поскольку специфичный для приматов Trp33 (ECD) послужил критической точкой при связывании именно малых молекул, но не нативного ГПП-1. Непептидные агонисты индуцируют изменение конформации ГПП-1Р посредством вандер-ваальсовых взаимодействий и водородных связей Trp33 (ECD) с внеклеточными петлями (ECL) 1 и ECL2 вместо прямого взаимодействия пептида с ECL2 [96]. TTP-273 имеет уникальные кинетические и сигнальные свойства и имеет отличный способ связывания по сравнению с ГПП-1 [97].

TTP273 (компания Transtech Pharmaceuticals (TTP), позже переименованная в vTv Therapeutics, США) разрабатывается в качестве перорального агониста ГПП-1Р с периодом полувыведения около 6 ч. Его 2-недельное введение вызывало выраженное дозозависимое снижение уровня гликемии, артериального давления (систолическое на 8 мм рт.ст., плацебо – 2 мм рт.ст., диастолическое до 5 мм рт.ст., плацебо – 1 мм рт.ст.), уровня триглицеридов (на 2,8 ммоль/л по сравнению с плацебо 1,7 ммоль/л) и массы тела: на 2 кг по сравнению с плацебо – 0,6 кг. В 12-недельном многоцентровом исследовании пациенты с СД2, получающие метформин, дополнительно получали TTP273 (150 мг 1 или 2 раза в сут) либо плацебо. На фоне приема TTP273 отмечались следующие плацебо-скорректированные показатели: HbA1c –0,86 и –0,71% соответственно (плацебо – HbA1c +0,15%). Снижение веса наблюдалось в среднем на 0,9 и 0,6 кг при приеме TTP273 1 и 2 раза в день, соответственно. В исследовании 2 под названием LOGRA (allosteric Oral Glp1 Receptor Agonist) оценивалась безопасность и эффективность TTP273 у пациентов с СД2 на стабильной дозе метформина, однако результаты пока не опубликованы. TTP-OAD2 – более слабый аналог TTP273 от этого же разработчика с медленной кинетикой, но раскрытой структурой. В клетках HEK293 (с высокой плотностью ГПП-1Р) соединение влияет на цАМФ без рекрутирования β -аррестина-1 [20, 90, 97, 98].

Соединения RGT1383 является полным агонистом ГПП-1Р, сопоставимо с ГПП-1 повышает цАМФ со значением EC_{50} около 0,2 нмоль/л и частичным агонистом рекрутирования β -аррестина на уровне ~ 30%. RGT1383 связывается с ортостерическим связывающим карманом благодаря внутреннему движению внеклеточной петли ECL3 и внеклеточного конца TM7. Кроме того, Trp33 внеклеточного N-концевого домена (ECD) играет критическую роль в связывании RGT1383 с человеческим рецептором ГПП-1 [20, 97].

Дануглипрон (PF-06882961, Pfizer Inc., США) представитель серии производных пиримидина, которое в исследованиях *in vitro* проявляет агонизм к ГПП-1Р выше, чем у некоторых близкородственных пептидов (эксендин-4, лираглутид и эндогенный оксинтомодулин). PF-06882961 повышает продукцию цАМФ (EC_{50} =13 нМ) и частично увеличивает уровень Ca^{2+} , привлечение pERK1/2 и β -аррестина. Сайты связывания для PF-06882961 и LY3502970 или CHU-128 в значительной степени перекрываются, хотя каждый из них занимает различное положение. Это существенное перекрытие объясняет видоспецифичность соединений PF-06882961 и LY3502970 [99]. Орфорглипрон LY3502970 (OWL833, Chuai Pharmaceutical, Япония и Eli Lilly, США) – это непептидный частичный агонист ГПП-1Р для

перорального применения. В исследованиях эффективности пероральное введение этого соединения снижало уровень глюкозы у гуманизированных мышей, трансгенных по ГПП-1Р, а также к инсулинозависимому и гипофагическому эффектам у нечеловекообразных приматов, на уровне сопоставимом с эксенатидом [20, 22]. Анализ семи рандомизированных контролируемых исследований орфорглипрона и дануглипрона показал значительное снижение массы тела и уровня HbA1c с низким риском развития гипогликемии, однако высокая частота (более 50%) желудочно-кишечных нежелательных явлений (тошнота и рвота) может существенно ограничить перспективы подобных препаратов [100].

Одними из первых описанных не пептидных агонистов ГПП-1Р представляют собой замещенные циклобутановые соединения, примером которых является соединения Voc5 (полный агонист) и S4P (частичный агонист). Эти соединения не активируют клетки без рецепторов ГПП-1 или клетки, экспрессирующие рецепторы глюкагона (GcgR) или рецепторы ГПП-2, их агонизм блокируется эксендином (9–39). Несмотря на высокую степень имитации эффектов пептидных агонистов ГПП-1Р соединение Voc5 и его более активное производное не получили дальнейшего развития в качестве пероральных лекарственных препаратов [20].

Алlostерические модуляторы ГПП-1Р разрабатываются в качестве лекарственных препаратов, которые, связываясь с различными алlostерическими центрами рецептора, могут обеспечить усиление действия эндогенных пептидных агонистов рецептора ГПП-1 (Рис. 5). Первые соединения, проявляющие подобную фармакологическую активность, были разработаны в компании Ново Нордиск (на основе хиноксалинов). Соединение, синтезированное данной компанией, является полным и высокоселективным агонистом ГПП-1Р, эффект отсутствует у животных нокаутных по целевому рецептору), увеличивает аффинность связывания ГПП-1 с рецептором, но не его активность. Обозначенное соединение менее активно чем ГПП-1, эксенатид или лираглутид стимулирует секрецию инсулина клетками BRIN-BD11. Производные хиноксалина требуют оптимизации с целью повышения химической стабильности и фармакокинетики. Аналог 2-тио-хиноксалина – соединение DA-15864 увеличивает стимулированную глюкозой секрецию инсулина и действует синергично с ГПП-1, значительно повышая пиковый уровень инсулина в плазме. Также сообщается, что совместное применение алlostерических модуляторов на основе хиноксалина с эксендином-4 оказывает выраженное нейропротекторное действие, которое было опосредовано стимуляцией ГПП-1Р через сигнальный путь цАМФ-РКА-CREB [20].

Фармацевтическая компания Domain Therapeutics разработала серию кверцетин-подобных флавоноидов (флавоны, изофлавоны и катехины), являющихся алlostерическими модуляторами ГПП-1Р [20], но не получивших развития в качестве лекарственных препаратов.

В компании Eli Lilly (США) выпустили ряд агонистов и положительных алlostерических модуляторов ГПП-1Р на основе пиримидина, которые оптимизированы для повышения сродства к ГПП-1Р и эффективности неактивного ГПП-1 (9–36) – основного метаболита ГПП-1(7-36). Активность ВЕТР не блокируется эксендином-4 (9–39); в исследованиях *in vivo* соединение стимулирует секрецию инсулина у крыс и секрецию инсулина, стимулируемую окситомодулином, что свидетельствует о его способности инициировать предвзятую передачу сигналов через окситомодулин-опосредованные ГПП-1Р. Исследования конкурентного связывания показали, что LSN3160440 совместно модулирует аффинность связывания и эффективность ГПП-1 (9–36) для активации рецептора ГПП-1. Соединение LSN3160440 в исследованиях *in vitro* и *in vivo* усиливало активность и повышало эффективность ГПП-1 (9–36) в отношении активации его рецептора. Совместное добавление LSN3160440 и ГПП-1 (9–36) к изолированным β -клеткам мышей или введение крысам Wistar значительно увеличивает глюкозозависимую секрецию инсулина (на уровне сопоставимом с ГПП-1). Данное соединение является единственным зарегистрированным алlostерическим модулятором рецептора, который одновременно взаимодействует как с ортостерическим лигандом, так и с рецептором [20, 101].

Malik F. и соавт. разработали инновационную систему высокопроизводительного скрининга с помощью которой были выявлены соединения VU00056556 и VU0109197 с общим ядром карбоксилата гексагидрохинолона и которые взаимодействовали с ГПП-1Р более плотно, чем нативный ГПП-1. После определения соединения лидера произвели оптимизацию его структуры, что привело к созданию VU0453379, которое оказывает предвзятый агонизм ГПП-1Р (высокоселективный агонист) и слабо влияет на рекрутирование β -аррестина, с приемлемыми метаболическим и фармакокинетическим профилем. Это соединение является первым из тех, которые преодолевают ГЭБ, что может быть важным для разработки центральных агонистов ГПП-1Р [20].

Соединения HIT-465 и HIT-736 (их структура не раскрывается) отличаются высокой биодоступностью и длительным периодом полувыведения и являются предвзятыми модуляторами ГПП-1Р, но сайт алlostерического связывания отличается от такового для соединения, разработанного компанией Ново Нордиск А/С [20].

Спиртовые экстракты из семян пажитника (*Trigonella foenum-graecum* L.) усиливают передачу сигналов ГПП-1, а их фракционирование и очистка привели к выделению соединения N55 (N-линолеил-2-амино-γ-бутиролактон). В исследованиях *in vitro* это соединение способствует накоплению ГПП-1-зависимого цАМФ и дозозависимому эндоцитозу рецепторов ГПП-1. Соединение N55 обладает уникальным механизмом действия – вместо связывания с аллостерическим сайтом ГПП-1R, подобно другим известным модуляторам, N55 напрямую связывается с ГПП-1(7–36)NH₂. Связывание N55 с ГПП-1 может индуцировать конформационные изменения в ГПП-1(7–36)NH₂, таким образом замедляя его расщепление и воздействие трипсина. Следовательно, N55 представляет собой новый класс аллостерических модуляторов ГПП-1R, и подобное воздействие на ГПП-1 может быть потенциальным для управления активностью этого рецептора [20, 102].

Группа ученых из Sanofi-Aventis Deutschland GmbH разработали соединение N14 на основе 3,4,5,6-тетрагидро-1H-1,5-эпиминоазино[4,5-b]индола, которое является наиболее мощным нековалентным аллостерическим модулятором ГПП-1R, стимулирует секрецию инсулина, обладает приемлемыми фармакокинетическими и фармакодинамическими характеристиками [20].

Все известные непептидные агонисты ГПП-1R связываются с ним преимущественно в спиральном пучке рецептора с карманом связывания, перекрывающимся с карманом для ГПП-1 способом, который либо аналогичен ему, либо отличается вовсе. Множественные активные конформации ГПП-1R обуславливают разную эффективность и предвзятый агонизм веществ. Сайты аллостерического связывания ГПП-1R расположены в нескольких местах во всех его структурах – на самом пептиде ГПП-1, внутри- и внеклеточных областях, а аллостерические модуляторы влияют на аффинность и эффективность ортостерических лигандов.

Комбинированная терапия на основе ГПП-1

В настоящее время применяются комбинированные формы с инсулином деглудек (Сультофай®, Ново Нордиск А/С, Дания) или гларгин (Соликва СолоСтар®, Санофи, Франция). Создание подобных комбинаций логично и объяснимо с точки зрения повышения эффективности гипогликемической терапии (за счет синергии в действии инсулина и агонистов ГПП-1R) и маркетинга (расширение продуктового портфеля за счёт объединения двух препаратов компании в один). Комбинирование аналогов ГПП-1R с базальным инсулином по сравнению с монотерапией быстрее и значительно снижают HbA1c [103].

Различные подходы к комбинированию агонистов ГПП-1R включают – комбинацию с амилином, глюкагоном [104], лептином, кальцитонином лосося, PYY, холецистокинин, агонистами рецепторов меланокортина-4 (MC4R) [105], различными аналогами инсулина [103], адреномедуллином [107] и агонистами β3-адренергического рецептора [108], агонистами / антагонистами каннабиноидного рецептора 1 (CB1) [109] и агонистами рецептора желчной кислоты (фарнезоид-х (FXR), NR1H4) [110].

Мультитаргетные молекулы на основе ГПП-1

Создание мультитаргетных молекул, которые будут взаимодействовать с несколькими рецепторами потенциально более привлекательно, чем монотерапия или комбинация отдельных препаратов по нескольким причинам. Во-первых, получить регистрационное удостоверение на молекулу проще, чем на комбинацию. Во-вторых, каждое вещество комбинации имеет уникальные фармакокинетические профили, которые уравниваются при слиянии молекул, ограничивая межиндивидуальную вариабельность метаболизма и фармакокинетического взаимодействия отдельных структур. В то же время активность одной молекулы постоянна, а в комбинации её можно титровать, изменяя соотношение компонентов в смеси, что особенно важно, если один из них имеет узкое терапевтическое окно.

Возможность использования глюкагона в составе многофункциональной молекулы, оказывающей гипогликемическое действие, изначально не рассматривалась, но его катаболические свойства (снижение уровня липидов) представляются заманчивыми, особенно если удастся снизить его гипергликемическое действие. Одним из возможных кандидатов, препятствующих или компенсирующих контринсулярное действие глюкагона является ГПП-1, в то же время оказывая весь спектр свойственных этому гормону эффектов. Так, совместное введение ГПП-1 и глюкагона приводило к уменьшению потребления пищи и увеличению расхода энергии. Длительное введение селективных моноагонистов в виде комбинаций приматам с ожирением вызывало большее снижение массы тела по сравнению с применением этих препаратов по отдельности [111].

Структурное сходство ГПП-1 с глюкагоном позволяет интегрировать их фармакологические эффекты путем объединения в одной молекуле. Доклинические исследования коагонистов ГПП-1 / глюкагона подтвердили целесообразность данного подхода, что привело к созданию большого количества подобных молекул (на основе глюкагона, оксинтомодулина и др.), которые в настоящее время проходят клинические испытания. Наиболее заметными являются соединения SAR425899 (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH) и MEDI0382 (AstraZeneca) клинические испытания, которых

дали многообещающие результаты в отношении их эффективности снижения гипергликемии и массы тела. Также было установлено, что соединение SAR425899 дозозависимо вызывает тяжелые побочные эффекты со стороны ЖКТ, что может ограничить его применение, в отношении соединения MEDI0382. Исследования этих двух соединений продолжаются [92, 104, 112].

Компания Ново Нордиск А/С разработала несколько длительно действующих двойных агонистов (NN1177, NN1151, NN1359), которые различаются сродством к рецепторам ГПП-1 и глюкагона. Эти соединения успешно прошли доклинические испытания, но при их проведении было обнаружено несколько системных проблем, которые возникли из-за видоспецифичности и количества соответствующих рецепторов, что осложняет оптимальный выбор соотношения активности в отношении ГПП-1 / глюкагона в подобных соединениях. Фармакодинамические эффекты коагонистов различаются у разных видов, зависят от экспозиции соединения и продолжительности исследования (развитие толерантности), что усложняет идентификацию оптимально сбалансированного клинического кандидата [104, 113].

Соединение GUB06-046 является коагонистом к рецептору секретина (SCTR) и ГПП-1, его применение значительно снижает массу тела, повышает утилизацию глюкозы и увеличивают массу β -клеток [114].

Создание мономолекулярных агонистов ГПП-1 и ГИП целесообразно с точки зрения усиления инсулинотропных эффектов. Также ГИП принимает участие в регуляции ремоделирования костной ткани и имеет терапевтический потенциал при остеопорозе. Вопрос о терапевтической ценности стимуляции или ингибирования рецепторов к ГИП остается открытым поскольку у пациентов с СД2 снижается чувствительность тканей к ГИП, которая может восстанавливаться на фоне нормализации гликемии [51, 104, 115].

Тирзепатид (LY3298176) – экспериментальный аналог ГИП и представляет собой линейный полипептид из 39 аминокислот. Часть жирной двухосновной кислоты (эйкозандиовая кислота) связана через глутаминовую кислоту две единицы (2-(2-аминоэтоксид)этоксид)уксусной кислоты к боковой цепи остатка лизина. Такое расположение обеспечивает гораздо более длительный период полураспада, увеличивая время между дозами из-за его высокого сродства к альбумину. Препарат вводят еженедельно подкожно. В 2021 году завершились испытания фазы 3 по всему миру. Тирзепатид имеет большее сродство к рецепторам ГИП, чем к рецепторам ГПП-1, что вызывает большее снижение гипергликемии по сравнению с селективными

агонистами ГПП-1Р. Тирзепатид имитирует действия природного ГИП, в отношении рецептора ГПП-1 стимулирует повышение цАМФ, но не β -аррестина, также он увеличивает уровни адипонектина, адипокина, участвующего в регуляции метаболизма глюкозы и липидов, с максимальным увеличением на 26% (доза 10 мг) от исходного уровня через 26 недель [93].

В мае 2022 года FDA одобрило инъекционный препарат Mounjaro™ (тирзепатид, Eli Lilly and Company, США) для приема 1 раз в неделю (в шести дозировках: 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 и 15 мг) в качестве дополнения к диете и физическим упражнениям для улучшения гликемического контроля у взрослых с СД2. Это первый и единственный одобренный FDA агонист рецепторов ГИП и ГПП-1, эффективность и безопасность которого была доказана в рамках программы SURPASS. Эффекты препарата сравнивали с семаглутидом для инъекций 1 мг, инсулином гларгин и инсулином деглудек. Была оценена эффективность препарата в дозе 5 мг, 10 мг и 15 мг, применяемого отдельно или в сочетании с метформином, ингибиторами SGLT2, производными сульфонилмочевины и инсулином гларгин. В одном из исследований программы SURPASS (SURPASS-4, NCT03730662) по сравнению с исходным уровнем HbA1c (8,5%), препарат снизил его в среднем на 2,1% (5 мг), 2,3% (10 мг) и 2,4% (15 мг) по сравнению с 1,4% для инсулина гларгин. Также он уменьшил вес пациентов с исходного в 90,3 кг в среднем на 6,4 (5 мг), 9 (10 мг) и 10,4 кг (15 мг) по сравнению с увеличением на 1,8 кг для инсулина гларгин [112, 116].

Основываясь на обладающей эффективностью коагонистов ГПП-1 / глюкагона и ГПП-1 / ГИП, было сделано предположение, что одна молекула с тройным агонизмом ко всем трем из этих рецепторов, может обеспечить большую эффективность, чем соответствующие коагонисты. В подобной молекуле фрагмент глюкагона отвечает за модуляцию обмена липидов [104, 106], фрагменты ГПП-1 и ГИП компенсируют гипергликемическое действие глюкагона, оказывают инсулинотропное действие и совместно способствуют снижению массы тела. Мономерный пептид проявляет тройной агонизм в отношении рецепторов ГПП-1, ГИП и Gcg, который более выраженно, чем соответствующие коагонисты и моноагонисты в доклинических исследованиях снижают массу тела [105]. Клинические исследования подобных лекарственных средств продолжаются.

Ретатрутид (LY3437943) является агонистом ГПП-1, ГИП и рецепторов глюкагона. В рамках проведения II фазы клинических исследований у пациентов с индексом массы тела более 30 наблюдалось снижение массы тела на 17,5% через 24 недели лечения и на 24,2% через 48 недель, что указывает

на существенный потенциал тройных агонистов при лечении избыточной массы тела [117].

Альтернативной получения химерных или гибридизированных пептидов с перемешанными последовательностями являются слитые молекулы или конъюгаты. Как отмечалось выше, сходство последовательностей семейства пептидов проглюкагона и структур их рецепторов делает возможным конструирование химерных пептидов с агонизмом по множеству рецепторов размерами сопоставимыми с нативными пептидами. В частности, уже опубликованы результаты исследований соединений, полученных слиянием молекулы ГПП-1 с гастрином, амилином, холецистокинином, FGF21 и ингибирующими антителами против PCSK9. Молекула ГПП-1 /гастрин (активны также в отношении родственного кишечного гормона ксенина) обладает потенциалом для восстановления β -клеток [118]. Молекула ГПП-1 /амилин и ГПП-1 / холецистокинин значительно снижают потребление пищи и уровень глюкозы в крови [104]. Слияние ГПП-1 с FGF21 или ГПП-1 с анти-PCSK9 привело к более выраженной (чем после применения агонистов ГПП-1Р) нормализации дислипидемии и массы тела [119]. В клинических исследованиях фазы I лечение пациентов с избыточным весом и ожирением препарат на основе ГПП-1 /anti-PCSK9 снижал уровень холестерина ЛПНП, но не улучшал метаболизм глюкозы [120].

Несмотря на многообещающие результаты доклинических исследований различных конъюгатов ГПП-1, необходимо установление клеточных механизмов реализации их эффектов, параметров фармакокинетики и совместимости /надежности трансляции данных в клиническую практику.

Подходы к созданию агонистов ГПП-1Р и их эффекты отображены на рисунке 6.

Стимуляторы секреции эндогенного ГПП-1

Помимо обозначенных выше фармакологических подходов к воздействию на рецептор ГПП-1, ведущие фармацевтические компании пытаются реализовать возможность повышения секреции инкретинов энтероэндокринными клетками кишечника путем стимулирования особой группы локализованных на них рецепторов. В нормальных условиях их физиологическими активаторами являются СЖК, поступающие с пищей или образующиеся в результате ферментации пищевых волокон под действием микробиоты кишечника. Эти рецепторы (GPR40, GPR41, GPR43, GPR119 и GPR120) были открыты при реализации проекта «геном человека», а в последующем была установлена их значимая роль в регуляции биосинтеза инкретинов и углеводном обмене. Активация рецепторов GPR40 помимо инкретинопосредованных эффектов оказывает гепато- и нейропротекторное действие, GPR41 и GPR43 влияет на метаболизм лептина,

дифференцировку адипоцитов нервную и иммунную системы [35, 36], метаболические и плейотропные эффекты агонистов GPR119 [35, 37] и GPR120 активно изучаются [26, 27, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, пептид, обнаруженный благодаря своей способности стимулировать секрецию инсулина, эволюционировал в класс лекарств с выраженной эффективностью в отношении прогрессирования диабета и избыточного веса /ожирения. Общепринятое описание его роли таково: ГПП-1 высвобождается из кишечника в кровоток после приема пищи, чтобы усилить секрецию инсулина и подавить секрецию глюкагона для эффективной утилизации поступающей из кишечника глюкозы и снижения гликемии к нормальным значениям (инкретиновый эффект), также ГПП-1 воздействует на афферентные нейроны блуждающего нерва и/или напрямую на ГМ для подавления аппетита и формирования насыщения. Помимо этого, широкое распространение рецептора к ГПП-1 в различных тканях и органах, его связь с внутриклеточными сигнальными каскадами, направленными на запуск энергетических анаболических процессов, обеспечивает кардио-, эндотелио- и нейропротективные эффекты ГПП-1, несвязанные с его гипогликемическим действием. Применение более сильных синтетических агонистов ГПП-1Р позволило выявить значительный терапевтический потенциал этих плейотропных свойств ГПП-1 с подтверждением в клинических исследованиях. Агонисты ГПП-1Р это класс лекарственных препаратов назначения, которых обеспечивает не только надежный гликемический контроль и снижение массы тела пациентов, но и сопровождается снижением риска развития сердечно-сосудистых осложнений СД. Агонисты ГПП-1 стимулируют биосинтез инсулина и пролиферацию β -клеток, а также ингибируют их апоптоз. Инкретиноподобные препараты хорошо переносятся, а самыми распространенным побочным эффектом этого класса является тошнота, что связано с центральным влиянием ГПП-1 на тонус желудка.

Помимо описанных примеров, продолжается разработка новых инкретиномиметиков: агонисты ГПП-1Р (VRS 859, эфегленатид, CJC-1134-PC, таспоглутид, глимера, TTP054, ZYOG1, ARI-1732TS), в том числе не пептидной природы (LY3502970, CHU-128, Voc5, S4P, TT-OAD2, RGT1383, PF06882961), аллостерические модуляторы рецептора (DA-15864, BETP, LSN3160440, VU00056556, VU0109197), новые комбинации (с лептином, кальцитонином лосося, PYY, холецистокинином, аналогами инсулина, аденомедуллином, агонистами β 3-адренергического рецептора, агонистами /антагонистами каннабиноидного

рецептора 1 (CB1), агонистами MC4R и агонистами NR1H4), молекулы на основе агонистов ГПП-1P с мультитаргетным механизмом действия (SAR425899, MEDI0382, GUB06-046, Тирзепатид), в том числе в виде конъюгатов с другими белками (гастроном, амилином, холецистокинином, FGF21 и ингибирующими антителами против PCSK9).

Агонисты ГПП-1P последовательно увеличивают своё присутствие на российском фармацевтическом рынке. Так, их доля с 2016 по 2020 год возросла с 0,09 до 0,41 % или с 2,3 до 10,56% от реализованных гипогликемических средств всех групп в натуральном

(упаковки) и стоимостном (рубли) выражении соответственно. Доминирующее положение занимает фармацевтическая компания Дании, в продуктовой портфеле которой на 2020 год отмечается 5 позиций, что позволяет этой компании занимать более 50% рынка в натуральном выражении и почти 70% в стоимостном.

Таким образом, агонисты ГПП-1P представляют собой не только класс эффективных и безопасных лекарственных средств для терапии СД2 и ожирения, но и стремительно развивающихся по самым передовым направлениям фармации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках гранта РНФ (проект № 20-75-10013).

ВКЛАД АВТОРОВ

Д.В. Куркин – идея и планирование структуры работы, оформление графического материала, редактирование и утверждение финальной версии рукописи; Д.А. Бакулин, Ю.В. Горбунова, В.Б. Сапарова, К.Н. Корянова, А.Н. Чумаченко, О.В. Иванова, Е.В. Павлова – сбор материала и написание черновика рукописи; Е.И. Морковин, А.В. Стрыгин, Ю.А. Колосов – сбор материала и редактирование финальной версии рукописи; М.А. Джавахян, А.В. Заборовский, И.И. Макаренко, Р.В. Драй, В.И. Петров – консультации по узкоспециализированным вопросам, утверждение финальной версии рукописи.

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю., Мокрышева Н.Г., Викулова О.К., Галстян Г.Р., Кураева Т.Л., Петеркова В.А., Смирнова О.М., Старостина Е.Г., Суркова Е.В., Сухарева О.Ю., Токмакова А.Ю., Шамхалова М.Ш., Ярек-Мартынова И.Я., Артемова Е.В., Бешлиева Д.Д., Бондаренко О.Н., Волеводз Н.Н., Гомова И.С., Григорян О.Р., Джемилова З.Н., Есаян Р.М., Ибрагимова Л.И., Калашников В.Ю., Кононенко И.В., Лаптев Д.Н., Липатов Д.В., Мельникова О.Г., Михина М.С., Мичурова М.С., Мотовилин О.Г., Никонова Т.В., Роживанов Р.В., Склиник И.А., Шестакова Е.А. «Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом». Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. 10-й выпуск // Сахарный диабет. – 2021. – Т. 24, № 1S. – С. 1–148. DOI: 10.14341/DM12802
2. Blonde L., Umpierrez G.E., Reddy S.S., McGill J.B., Berga S.L., Bush M., Chandrasekaran S., DeFronzo R.A., Einhorn D., Galindo R.J., Gardner T.W., Garg R., Garvey W.T., Hirsch I.B., Hurley D.L., Izuora K., Kosiborod M., Olson D., Patel S.B., Pop-Busui R., Sadhu A.R., Samson S.L., Stec C., Tamborlane W.V. Jr, Tuttle K.R., Twining C., Vella A., Vellanki P., Weber S.L. American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice Guideline: Developing a Diabetes Mellitus Comprehensive Care Plan-2022 Update // Endocr Pract. – 2022. – Vol. 28, No. 10. – P. 923–1049. DOI: 10.1016/j.eprac.2022.08.002
3. Saisho Y. Incretin-based therapy and pancreatitis: accumulating evidence and unresolved questions // Ann Transl Med. – 2018. – Vol. 6, No. 7. – P. 131. DOI: 10.21037/atm.2018.02.24
4. Müller T.D., Finan B., Bloom S.R., D'Alessio D., Drucker D.J., Flatt P.R., Fritsche A., Gribble F., Grill H.J., Habener J.F., Holst J.J., Langhans W., Meier J.J., Nauck M.A., Perez-Tilve D., Pocai A., Reimann F., Sandoval D.A., Schwartz T.W., Seeley R.J., Stemmer K., Tang-Christensen M., Woods S.C., DiMarchi R.D., Tschöp M.H. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) // Mol Metab. – 2019. – Vol. 30. – P. 72–130. DOI: 10.1016/j.molmet.2019.09.010
5. Holst J.J. From the Incretin Concept and the Discovery of GLP-1 to Today's Diabetes Therapy // Front Endocrinol (Lausanne). – 2019. – Vol. 10. – P. 260. DOI: 10.3389/fendo.2019.00260
6. Sharma D., Verma S., Vaidya S., Kalia K., Tiwari V. Recent updates on GLP-1 agonists: Current advancements & challenges // Biomed. Pharmacother. – 2018. – Vol. 108. – P. 952–962. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.088
7. Brierley D.I., de Lartigue G. Reappraising the role of the vagus nerve in GLP-1-mediated regulation of eating // Br J Pharmacol. – 2022. – Vol. 179, No. 4. – P. 584–599. DOI: 10.1111/bph.15603
8. Singh I., Wang L., Xia B., Liu J., Tahiri A., El Ouaamari A., Wheeler M.B., Pang Z.P. Activation of arcuate nucleus glucagon-like peptide-1 receptor-expressing neurons suppresses food intake // Cell Biosci. – 2022. – Vol. 12, No. 1. – P. 178. DOI: 10.1186/s13578-022-00914-3
9. Gabe M.B.N., Skov-Jepesen K., Gasbjerg L.S., Schiellerup S.P., Martinussen C., Gadgaard S., Boer G.A., Oeke J., Torz L.J., Veedfald S., Svane M.S., Bojsen-

- Møller K.N., Madsbad S., Holst J.J., Hartmann B., Rosenkilde M.M. GIP and GLP-2 together improve bone turnover in humans supporting GIPR-GLP-2R co-agonists as future osteoporosis treatment // *Pharmacol Res.* – 2022. – Vol. 176. – P. 106058. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106058
10. Henriksen D.B., Alexandersen P., Hartmann B., Adrian C.L., Byrjalsen I., Bone H.G., Holst J.J., Christiansen C. Four-month treatment with GLP-2 significantly increases hip BMD: a randomized, placebo-controlled, dose-ranging study in postmenopausal women with low BMD // *Bone.* – 2009. – Vol. 45, No. 5. – P. 833–842. DOI: 10.1016/j.bone.2009.07.008
 11. Greco E.V., Russo G., Giandalia A., Viazzi F., Pontremoli R., De Cosmo S. GLP-1 Receptor Agonists and Kidney Protection // *Medicina (Kaunas).* – 2019. – Vol. 55, No. 6. – P. 233. DOI: 10.3390/medicina55060233
 12. Zhao X., Wang M., Wen Z., Lu Z., Cui L., Fu C., Xue H., Liu Y., Zhang Y. GLP-1 Receptor Agonists: Beyond Their Pancreatic Effects // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* – 2021. – Vol. 12. – P. 721135. DOI: 10.3389/fendo.2021.721135
 13. Whalley N.M., Pritchard L.E., Smith D.M., White A. Processing of proglucagon to GLP-1 in pancreatic α -cells: is this a paracrine mechanism enabling GLP-1 to act on β -cells? // *J Endocrinol.* – 2011. – Vol. 211, No. 1. – P. 99–106. DOI: 10.1530/JOE-11-0094
 14. Wideman R.D., Yu I.L., Webber T.D., Verchere C.B., Johnson J.D., Cheung A.T., Kieffer T.J. Improving function and survival of pancreatic islets by endogenous production of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2006. – Vol. 103, No. 36. – P. 13468–13473. DOI: 10.1073/pnas.0600655103
 15. Jun L.S., Millican R.L., Hawkins E.D., Konkol D.L., Showalter A.D., Christe M.E., Michael M.D., Sloop K.W. Absence of glucagon and insulin action reveals a role for the GLP-1 receptor in endogenous glucose production // *Diabetes.* – 2015. – Vol. 64, No. 3. – P. 819–827. DOI: 10.2337/db14-1052
 16. Capozzi M.E., Svendsen B., Encisco S.E., Lewandowski S.L., Martin M.D., Lin H., Jaffe J.L., Coch R.W., Haldeman J.M., MacDonald P.E., Merrins M.J., D'Alessio D.A., Campbell J.E. β Cell tone is defined by proglucagon peptides through cAMP signaling // *JCI Insight.* – 2019. – Vol. 4, No. 5. – P. e126742. DOI: 10.1172/jci.insight.126742
 17. Zhao F., Zhou Q., Cong Z., Hang K., Zou X., Zhang C., Chen Y., Dai A., Liang A., Ming Q., Wang M., Chen L.N., Xu P., Chang R., Feng W., Xia T., Zhang Y., Wu B., Yang D., Zhao L., Xu H.E., Wang M.W. Structural insights into multiplexed pharmacological actions of tirzepatide and peptide 20 at the GIP, GLP-1 or glucagon receptors // *Nat Commun.* – 2022. – Vol. 13, No. 1. – P. 1057. DOI: 10.1038/s41467-022-28683-0
 18. Svendsen B., Larsen O., Gabe M.B.N., Christiansen C.B., Rosenkilde M.M., Drucker D.J., Holst J.J. Insulin Secretion Depends on Intra-islet Glucagon Signaling // *Cell Rep.* – 2018. – Vol. 25, No. 5. – P. 1127–1134.e2. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.10.018
 19. Holst J.J. Glucagon-like peptide-1: Are its roles as endogenous hormone and therapeutic wizard congruent? // *J Intern Med.* – 2022. – Vol. 291, No. 5. – P. 557–573. DOI: 10.1111/joim.13433
 20. Malik F., Li Z. Non-peptide agonists and positive allosteric modulators of glucagon-like peptide-1 receptors: Alternative approaches for treatment of Type 2 diabetes // *Br J Pharmacol.* – 2022. – Vol. 179, No. 4. – P. 511–525. DOI: 10.1111/bph.15446
 21. McLean B.A., Wong C.K., Campbell J.E., Hodson D.J., Trapp S., Drucker D.J. Revisiting the Complexity of GLP-1 Action from Sites of Synthesis to Receptor Activation // *Endocr Rev.* – 2021. – Vol. 42, No. 2. – P. 101–132. DOI: 10.1210/edrv/bnaa032
 22. Choe H.J., Cho Y.M. Peptidyl and Non-Peptidyl Oral Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists // *Endocrinol. Metab. (Seoul).* – 2021. – Vol. 36, No. 1. – P. 22–29. DOI: 10.3803/EnM.2021.102
 23. Kawai T., Sun B., Yoshino H., Feng D., Suzuki Y., Fukazawa M., Nagao S., Wainscott D.B., Showalter A.D., Droz B.A., Kobilka T.S., Coghlan M.P., Willard F.S., Kawabe Y., Kobilka B.K., Sloop K.W. Structural basis for GLP-1 receptor activation by LY3502970, an orally active nonpeptide agonist // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2020. – Vol. 117, No. 47. – P. 29959–29967. DOI: 10.1073/pnas.2014879117
 24. Pyke C., Heller R.S., Kirk R.K., Ørskov C., Reedtz-Runge S., Kastrup P., Hvelplund A., Bardram L., Calatayud D., Knudsen L.B. GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody // *Endocrinology.* – 2014. – Vol. 155, No. 4. – P. 1280–1290. DOI: 10.1210/en.2013-1934
 25. Richards P., Parker H.E., Adriaenssens A.E., Hodgson J.M., Cork S.C., Trapp S., Gribble F.M., Reimann F. Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model // *Diabetes.* – 2014. – Vol. 63, No. 4. – P. 1224–1233. DOI: 10.2337/db13-1440
 26. Hjørne A.P., Modvig I.M., Holst J.J. The Sensory Mechanisms of Nutrient-Induced GLP-1 Secretion // *Metabolites.* – 2022. – Vol. 12, No. 5. – P. 420. DOI: 10.3390/metabo12050420
 27. Mayendraraj A., Rosenkilde M.M., Gasbjerg L.S. GLP-1 and GIP receptor signaling in beta cells – a review of receptor interactions and co-stimulation // *Peptides.* – 2022. – Vol. 151. – P. 170749. DOI: 10.1016/j.peptides.2022.170749
 28. Wootten D., Reynolds C.A., Smith K.J., Mobarec J.C., Koole C., Savage E.E., Pabreja K., Simms J., Sridhar R., Furness S.G.B., Liu M., Thompson P.E., Miller L.J., Christopoulos A., Sexton P.M. The Extracellular Surface of the GLP-1 Receptor Is a Molecular Trigger for Biased Agonism // *Cell.* – 2016. – Vol. 165, No. 7. – P. 1632–1643. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.023
 29. Spreckley E., Murphy K.G. The L-Cell in Nutritional Sensing and the Regulation of Appetite // *Front Nutr.* – 2015. – Vol. 2. – P. 23. DOI: 10.3389/fnut.2015.00023
 30. Wang X., Liu H., Chen J., Li Y., Qu S. Multiple Factors Related to the Secretion of Glucagon-Like Peptide-1 // *Int J Endocrinol.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 651757. DOI: 10.1155/2015/651757
 31. Alavi S.E., Cabot P.J., Moyle P.M. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists and Strategies To Improve Their Efficiency // *Mol Pharm.* – 2019. – Vol. 16, No. 6. – P. 2278–2295. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00308
 32. Eriksson L., Nyström T. Antidiabetic agents and endothelial dysfunction – beyond glucose control. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* – 2015. – Vol. 117, No. 1. – P. 15–25. DOI: 10.1111/bcpt.12402
 33. Calanna S., Christensen M., Holst J.J., Laferrère B., Glud L.L., Vilsbøll T., Knop F.K. Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies // *Diabetologia.* – 2013. – Vol. 56, No. 5. – P. 965–972. DOI: 10.1007/s00125-013-2841-0

34. Kuhre R.E., Frost C.R., Svendsen B., Holst J.J. Molecular mechanisms of glucose-stimulated GLP-1 secretion from perfused rat small intestine // *Diabetes*. – 2015. – Vol. 64, No. 2. – P. 370–382. DOI: 10.2337/db14-0807
35. Tyurenkov I.N., Ozerov A.A., Kurkin D.V., Logvinova E.O., Bakulin D.A., Volotova E.V., Borodin D.D. Structure and biological activity of endogenous and synthetic agonists of GPR119 // *Russian Chemical Reviews*. – 2018. – Vol. 87, No. 2. – P. 151–166. DOI: 10.1070/rcr4737
36. Тюреньков И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Бакулин Д.А. Роль микрофлоры кишечника, состава пищи, GPR41- и GPR43-рецепторов к короткоцепочечным жирным кислотам в энергетическом обмене позвоночных животных // *Успехи физиологических наук*. – 2017. – Т. 48, № 2. – С. 100–112.
37. Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Bakulin D.A., Volotova E.V., Morkovin E.I., Chafeev M.A., Karapetian R.N. Chemistry and Hypoglycemic Activity of GPR119 Agonist ZB-16 // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2018. – Vol. 9. – P. 543. DOI: 10.3389/fendo.2018.00543
38. Im D.S. GPR119 and GPR55 as Receptors for Fatty Acid Ethanolamides, Oleoylethanolamide and Palmitoylethanolamide // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22, No. 3. – P. 1034. DOI: 10.3390/ijms22031034
39. Higuchi N., Hira T., Yamada N., Hara H. Oral administration of corn zein hydrolysate stimulates GLP-1 and GIP secretion and improves glucose tolerance in male normal rats and Goto-Kakizaki rats // *Endocrinology*. – 2013. – Vol. 154, No. 9. – P. 3089–3098. DOI: 10.1210/en.2012-2275
40. Gagnon J., Baggio L.L., Drucker D.J., Brubaker P.L. Ghrelin Is a Novel Regulator of GLP-1 Secretion // *Diabetes*. – 2015. – Vol. 64, No. 5. – P. 1513–1521. DOI: 10.2337/db14-1176
41. Hansen L., Lampert S., Mineo H., Holst J.J. Neural regulation of glucagon-like peptide-1 secretion in pigs // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. – 2004. – Vol. 287, No. 5. – P. E939–947. DOI: 10.1152/ajpendo.00197.2004
42. Persson K., Gingerich R.L., Nayak S., Wada K., Wada E., Ahrén B. Reduced GLP-1 and insulin responses and glucose intolerance after gastric glucose in GRP receptor-deleted mice // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. – 2000. – Vol. 279, No. 5. – P. E956–962. DOI: 10.1152/ajpendo.2000.279.5.E956
43. Han Y.E., Kang C.W., Oh J.H., Park S.H., Ku C.R., Cho Y.H., Lee M.K., Lee E.J. Olfactory Receptor OR51E1 Mediates GLP-1 Secretion in Human and Rodent Enteroendocrine L Cells // *J Endocr Soc*. – 2018. – Vol. 2, No. 11. – P. 1251–1258. DOI: 10.1210/js.2018-00165
44. Tomas A., Jones B., Leech C. New Insights into Beta-Cell GLP-1 Receptor and cAMP Signaling // *J Mol Biol*. – 2020. – Vol. 432, No. 5. – P. 1347–1366. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.08.009
45. Gromada J., Brock B., Schmitz O., Rorsman P. Glucagon-like peptide-1: regulation of insulin secretion and therapeutic potential // *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. – 2004. – Vol. 95, No. 6. – P. 252–262. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2004.t011-1-pto950502.x
46. Buteau J. GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival // *Diabetes Metab*. – 2008. – Vol. 34 Suppl 2. – P. S73–77. DOI: 10.1016/S1262-3636(08)73398-6
47. Park S., Dong X., Fisher T.L., Dunn S., Omer A.K., Weir G., White M.F. Exendin-4 uses Irs2 signaling to mediate pancreatic beta cell growth and function // *J Biol Chem*. – 2006. – Vol. 281, No. 2. – P. 1159–1168. DOI: 10.1074/jbc.M508307200
48. Peng W., Zhou R., Sun Z.F., Long J.W., Gong Y.Q. Novel Insights into the Roles and Mechanisms of GLP-1 Receptor Agonists against Aging-Related Diseases // *Aging Dis*. – 2022. – Vol. 13, No. 2. – P. 468–490. DOI: 10.14336/AD.2021.0928
49. Oh Y.S., Jun H.S. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling // *Int J Mol Sci*. – 2017. – Vol. 19, No. 1. – P. 26. DOI: 10.3390/ijms19010026
50. Urusova I.A., Farilla L., Hui H., D'Amico E., Perfetti R. GLP-1 inhibition of pancreatic islet cell apoptosis // *Trends Endocrinol Metab*. – 2004. – Vol. 15, No. 1. – P. 27–33. DOI: 10.1016/j.tem.2003.11.006
51. Drucker D.J. Mechanisms of action and therapeutic application of glucagon-like peptide-1 // *Cell Metab*. – 2018. – Vol. 27, No. 4. – P. 740–756. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.03.001
52. De Marinis Y.Z., Salehi A., Ward C.E., Zhang Q., Abdulkader F., Bengtsson M., Braha O., Braun M., Ramracheya R., Amisten S., Habib A.M., Moritoh Y., Zhang E., Reimann F., Rosengren A., Shibasaki T., Gribble F., Renström E., Seino S., Eliasson L., Rorsman P. GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N⁺ and L-type Ca²⁺ channel-dependent exocytosis // *Cell Metab*. – 2010. – Vol. 11, No. 6. – P. 543–553. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.04.007
53. Ravassa S., Zudaire A., Díez J. GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside // *Cardiovasc Res*. – 2012. – Vol. 94, No. 2. – P. 316–323. DOI: 10.1093/cvr/cvs123
54. Bremholm L., Andersen U.B., Hornum M., Hilsted L., Veedfald S., Hartmann B., Holst J.J. Acute effects of glucagon-like peptide-1, GLP-19-36 amide, and exenatide on mesenteric blood flow, cardiovascular parameters, and biomarkers in healthy volunteers // *Physiol Rep*. – 2017. – Vol. 5, No. 4. – P. e13102. DOI: 10.14814/phy2.13102
55. Sun F., Wu S., Guo S., Yu K., Yang Z., Li L., Zhang Y., Quan X., Ji L., Zhan S. Impact of GLP-1 receptor agonists on blood pressure, heart rate and hypertension among patients with type 2 diabetes: A systematic review and network meta-analysis // *Diabetes Res Clin Pract*. – 2015. – Vol. 110, No. 1. – P. 26–37. DOI: 10.1016/j.diabres.2015.07.015
56. Erbil D., Eren C.Y., Demirel C., Küçüker M.U., Solaroğlu I., Eser H.Y. GLP-1's role in neuroprotection: a systematic review // *Brain Inj*. – 2019. – Vol. 33, No. 6. – P. 734–819. DOI: 10.1080/02699052.2019.1587000
57. Heppner K.M., Kirigiti M., Secher A., Paulsen S.J., Buckingham R., Pyke C., Knudsen L.B., Vrang N., Grove K.L. Expression and distribution of glucagon-like peptide-1 receptor mRNA, protein and binding in the male nonhuman primate (*Macaca mulatta*) brain // *Endocrinology*. – 2015. – Vol. 156, No. 1. – P. 255–267. DOI: 10.1210/en.2014-1675
58. Kabahizi A., Wallace B., Lieu L., Chau D., Dong Y., Hwang E.S., Williams K.W. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) signalling in the brain: From neural circuits and metabolism to therapeutics // *Br J Pharmacol*. – 2022. – Vol. 179, No. 4. – P. 600–624. DOI: 10.1111/bph.15682
59. Trapp S., Brierley D.I. Brain GLP-1 and the regulation of food intake: GLP-1 action in the brain and its implications for GLP-1 receptor agonists in obesity treatment // *Br J Pharmacol*. – 2022. – Vol. 179, No. 4. – P. 557–570. DOI: 10.1111/bph.15638
60. Alhadeff A.L., Mergler B.D., Zimmer D.J., Turner C.A., Reiner D.J., Schmidt H.D., Grill H.J., Hayes M.R.

- Endogenous glucagon-like peptide-1 receptor signaling in the nucleus tractus solitarius is required for food intake control // *Neuropsychopharmacology*. – 2017. – Vol. 42, No. 7. – P. 1471–1479. DOI: 10.1038/npp.2016.246
61. Ong Z.Y., Liu J.J., Pang Z.P., Grill H.J. Paraventricular thalamic control of food intake and reward: role of glucagon-like peptide-1 receptor signaling // *Neuropsychopharmacology*. – 2017. – Vol. 42, No. 12. – P. 2387–2397. DOI: 10.1038/npp.2017.150
 62. Adams J.M., Pei H., Sandoval D.A., Seeley R.J., Chang R.B., Liberles S.D., Olson D.P. Liraglutide modulates appetite and body weight through glucagon-like peptide 1 receptor-expressing glutamatergic neurons // *Diabetes*. – 2018. – Vol. 67, No. 8. – P. 1538–1548. DOI: 10.2337/db17-1385
 63. Hayes M.R., Lechner T.M., Zhao S., Lee G.S., Chowansky A., Zimmer D., De Jonghe B.C., Kanoski S.E., Grill H.J., Bence K.K. Intracellular signals mediating the food intake-suppressive effects of hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation // *Cell Metab*. – 2011. – Vol. 13, No. 3. – P. 320–330. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.02.001
 64. Sirohi S., Schurdak J.D., Seeley R.J., Benoit S.C., Davis J.F. Central & peripheral glucagon-like peptide-1 receptor signaling differentially regulate addictive behaviors // *Physiol Behav*. – 2016. – Vol. 161. – P. 140–144. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.04.013
 65. Dossat A.M., Diaz R., Gallo L., Panagos A., Kay K., Williams D.L. Nucleus accumbens GLP-1 receptors influence meal size and palatability // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. – 2013. – Vol. 304, No. 12. – P. E1314–1320. DOI: 10.1152/ajpendo.00137.2013
 66. Hisadome K., Reimann F., Gribble F.M., Trapp S. CCK stimulation of GLP-1 neurons involves α 1-adrenoceptor-mediated increase in glutamatergic synaptic inputs // *Diabetes*. – 2011. – Vol. 60, No. 11. – P. 2701–2709. DOI: 10.2337/db11-0489
 67. Gaykema R.P., Newmyer B.A., Ottolini M., Raje V., Warthen D.M., Lambeth P.S., Niccum M., Yao T., Huang Y., Schulman I.G., Harris T.E., Patel M.K., Williams K.W., Scott M.M. Activation of murine pre-proglucagon-producing neurons reduces food intake and body weight // *J Clin Invest*. – 2017. – Vol. 127, No. 3. – P. 1031–1045. DOI: 10.1172/JCI81335
 68. Holt M.K., Richards J.E., Cook D.R., Brierley D.I., Williams D.L., Reimann F., Gribble F.M., Trapp S. Preproglucagon neurons in the nucleus of the solitary tract are the main source of brain GLP-1, mediate stress-induced hypophagia, and limit unusually large intakes of food // *Diabetes*. – 2019. – Vol. 68, No. 1. – P. 21–33. DOI: 10.2337/db18-0729
 69. Lee S.J., Sanchez-Watts G., Krieger J.P., Pignatola A., Norell P.N., Cortella A., Pettersen K.G., Vrdoljak D., Hayes M.R., Kanoski S.E., Langhans W., Watts A.G. Loss of dorsomedial hypothalamic GLP-1 signaling reduces BAT thermogenesis and increases adiposity // *Mol Metab*. – 2018. – Vol. 11. – P. 33–46. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.03.008
 70. Maselli D.B., Camilleri M. Effects of GLP-1 and Its Analogs on Gastric Physiology in Diabetes Mellitus and Obesity // *Adv Exp Med Biol*. – 2021. – Vol. 1307. – P. 171–192. DOI: 10.1007/5584_2020_496
 71. Ghosal S., Packard A.E.B., Mahbod P., McKlveen J.M., Seeley R.J., Myers B., Ulrich-Lai Y., Smith E.P., D'Alessio D.A., Herman J.P. Disruption of Glucagon-Like Peptide 1 Signaling in Sim1 Neurons Reduces Physiological and Behavioral Reactivity to Acute and Chronic Stress // *J Neurosci*. – 2017. – Vol. 37, No. 1. – P. 184–193. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1104-16.2016
 72. Salcedo I., Tweedie D., Li Y., Greig N.H. Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders // *Br J Pharmacol*. – 2012. – Vol. 166, No. 5. – P. 1586–1599. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01971.x
 73. Monti G., Gomes Moreira D., Richner M., Mutsaers H.A.M., Ferreira N., Jan A. GLP-1 Receptor Agonists in Neurodegeneration: Neurovascular Unit in the Spotlight // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, No. 13. – P. 2023. DOI: 10.3390/cells11132023
 74. Chang C.C., Lin T.C., Ho H.L., Kuo C.Y., Li H.H., Korolenko T.A., Chen W.J., Lai T.J., Ho Y.J., Lin C.L. GLP-1 Analogue Liraglutide Attenuates Mutant Huntingtin-Induced Neurotoxicity by Restoration of Neuronal Insulin Signaling // *Int J Mol Sci*. – 2018. – Vol. 19, No. 9. – P. 2505. DOI: 10.3390/ijms19092505
 75. Qi L., Ke L., Liu X., Liao L., Ke S., Liu X., Wang Y., Lin X., Zhou Y., Wu L., Chen Z., Liu L. Subcutaneous administration of liraglutide ameliorates learning and memory impairment by modulating tau hyperphosphorylation via the glycogen synthase kinase-3 β pathway in an amyloid β protein induced alzheimer disease mouse model // *Eur J Pharmacol*. – 2016. – Vol. 783. – P. 23–32. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.04.052
 76. Chen S., Sun J., Zhao G., Guo A., Chen Y., Fu R., Deng Y. Liraglutide Improves Water Maze Learning and Memory Performance While Reduces Hyperphosphorylation of Tau and Neurofilaments in APP/PS1/Tau Triple Transgenic Mice // *Neurochem Res*. – 2017. – Vol. 42, No. 8. – P. 2326–2335. DOI: 10.1007/s11064-017-2250-8
 77. Hansen H.H., Fabricius K., Barkholt P., Niehoff M.L., Morley J.E., Jelsing J., Pyke C., Knudsen L.B., Farr S.A., Vrang N. The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide Improves Memory Function and Increases Hippocampal CA1 Neuronal Numbers in a Senescence-Accelerated Mouse Model of Alzheimer's Disease // *J Alzheimers Dis*. – 2015. – Vol. 46, No. 4. – P. 877–888. DOI: 10.3233/JAD-143090
 78. Gejl M., Brock B., Egefjord L., Vang K., Rungby J., Gjedde A. Blood-Brain Glucose Transfer in Alzheimer's disease: Effect of GLP-1 Analog Treatment // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7, No. 1. – P. 17490. DOI: 10.1038/s41598-017-17718-y
 79. Watson K.T., Wroolie T.E., Tong G., Foland-Ross L.C., Frangou S., Singh M., McIntyre R.S., Roat-Shumway S., Myoraku A., Reiss A.L., Rasgon N.L. Neural correlates of liraglutide effects in persons at risk for Alzheimer's disease // *Behav Brain Res*. – 2019. – Vol. 356. – P. 271–278. DOI: 10.1016/j.bbr.2018.08.006
 80. Femminella G.D., Frangou E., Love S.B., Busza G., Holmes C., Ritchie C., Lawrence R., McFarlane B., Tadros G., Ridha B.H., Bannister C., Walker Z., Archer H., Coulthard E., Underwood B.R., Prasanna A., Koranteng P., Karim S., Junaid K., McGuinness B., Nilforooshan R., Macharouthu A., Donaldson A., Thacker S., Russell G., Malik N., Mate V., Knight L., Kshemendran S., Harrison J., Hölscher C., Brooks D.J., Passmore A.P., Ballard C., Edison P. Evaluating the effects of the novel GLP-1 analogue liraglutide in Alzheimer's disease: study protocol for a randomised controlled trial (ELAD study) // *Trials*. – 2019. – Vol. 20, No. 1. – P. 191. DOI: 10.1186/s13063-019-3259-x
 81. Li Y., Perry T., Kindy M.S., Harvey B.K., Tweedie D., Holloway H.W., Powers K., Shen H., Egan J.M., Sambamurti K., Brossi A., Lahiri D.K., Mattson M.P.,

- Hoffer B.J., Wang Y., Greig N.H. GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2009. – Vol. 106, No. 4. – P. 1285–1290. DOI: 10.1073/pnas.0806720106
82. Rampersaud N., Harkavyi A., Giordano G., Lever R., Whittton J., Whittton P.S. Exendin-4 reverses biochemical and behavioral deficits in a pre-motor rodent model of Parkinson's disease with combined noradrenergic and serotonergic lesions // *Neuropeptides*. – 2012. – Vol. 46, No. 5. – P. 183–193. DOI: 10.1016/j.npep.2012.07.004
83. Athauda D., MacLagan K., Skene S.S., Bajwa-Joseph M., Letchford D., Chowdhury K., Hibbert S., Budnik N., Zampedri L., Dickson J., Li Y., Aviles-Olmos I., Warner T.T., Limousin P., Lees A.J., Greig N.H., Tebbs S., Foltynie T. Exenatide once weekly versus placebo in Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet*. – 2017. – Vol. 390, No. 10103. – P. 1664–1675. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31585-4
84. Basalay M.V., Davidson S.M., Yellon D.M. Neuroprotection in Rats Following Ischaemia-Reperfusion Injury by GLP-1 Analogues-Liraglutide and Semaglutide // *Cardiovasc Drugs Ther.* – 2019. – Vol. 33, No. 6. – P. 661–667. DOI: 10.1007/s10557-019-06915-8
85. Gerstein H.C., Colhoun H.M., Dagenais G.R., Diaz R., Lakshmanan M., Pais P., Probstfield J., Botros F.T., Riddle M.C., Rydén L., Xavier D., Atisso C.M., Dyal L., Hall S., Rao-Melacini P., Wong G., Avezum A., Basile J., Chung N., Conget I., Cushman W.C., Franek E., Hancu N., Hanefeld M., Holt S., Jansky P., Keltai M., Lanás F., Leiter L.A., Lopez-Jaramillo P., Cardona Munoz E.G., Pirags V., Pogosova N., Raubenheimer P.J., Shaw J.E., Sheu W.H., Temelkova-Kurktschiev T.; REWIND Investigators. Dulaglutide and renal outcomes in type 2 diabetes: an exploratory analysis of the REWIND randomised, placebo-controlled trial // *Lancet*. – 2019. – Vol. 394, No. 10193. – P. 131–138. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31150-X
86. Hansen M.S., Frost M. Alliances of the gut and bone axis // *Semin Cell Dev Biol.* – 2022. – Vol. 123. – P. 74–81. DOI: 10.1016/j.semcdb.2021.06.024
87. Mieczkowska A., Mansur S., Bouvard B., Flatt P.R., Thorens B., Irwin N., Chappard D., Mabileau G. Double incretin receptor knock-out (DIRKO) mice present with alterations of trabecular and cortical micromorphology and bone strength // *Osteoporos Int.* – 2015. – Vol. 26, No. 1. – P. 209–218. DOI: 10.1007/s00198-014-2845-8
88. Maagensen H., Helsted M.M., Gasbjerg L.S., Vilsbøll T., Knop F.K. The Gut-Bone Axis in Diabetes // *Curr Osteoporos Rep.* – 2022. DOI: 10.1007/s11914-022-00767-2
89. Nauck M.A., Quast D.R., Wefers J., Meier J.J. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes – state-of-the-art // *Mol Metab.* – 2021. – Vol. 46. – P. 101102. DOI: 10.1016/j.molmet.2020.101102
90. Tomlinson B., Hu M., Zhang Y., Chan P., Liu Z.M. An overview of new GLP-1 receptor agonists for type 2 diabetes // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2016. – Vol. 25, No. 2. – P. 145–158. DOI: 10.1517/13543784.2016.1123249
91. Yang X., Qiang Q., Li N., Feng P., Wei W., Hölscher C. Neuroprotective Mechanisms of Glucagon-Like Peptide-1-Based Therapies in Ischemic Stroke: An Update Based on Preclinical Research // *Front Neurol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 844697. DOI: 10.3389/fneur.2022.844697
92. Cheang J.Y., Moyle P.M. Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)-based therapeutics: current status and future opportunities beyond Type 2 Diabetes // *ChemMedChem.* – 2018. – Vol. 13, No. 7. – P. 662–671. DOI: 10.1002/cmdc.201700781
93. Kalra S., Bhattacharya S., Kapoor N. Contemporary classification of glucagon-like peptide 1 receptor Agonists (GLP1RAs) // *Diabetes Ther.* – 2021. – Vol. 12, No. 8. – P. 2133–2147. DOI: 10.1007/s13300-021-01113-y
94. Аметов А.С., Шохин И.Е., Рогожина Е.А., Бодрова Т.Г., Невретдинова М.Е., Белый П.А., Заславская К.Я., Куркин Д.В., Корянова К.Н., Мищенко Е.С., Носков С.М. Российская разработка для лекарственной независимости в эндокринологии: сравнительный анализ биоэквивалентности, безопасности и переносимости первого отечественного лираглутида // *Фармация и фармакология*. – 2023. – Т. 11, № 3. – С. 255–276. DOI: 10.19163/2307-9266-2023-11-3-255-276
95. Арефьева А.Н., Банко В.В., Садовских М.О., Носков С.М. Первый препарат семаглутида в Российской Федерации: результаты открытого рандомизированного исследования фармакокинетики // *Медицинский совет*. – 2023. – Т. 17, № 16. – С. 77–82. DOI: 10.21518/ms2023-312
96. Zhang X., Belousoff M.J., Zhao P., Kooistra A.J., Truong T.T., Ang S.Y., Underwood C.R., Egebjerg T., Šenel P., Stewart G.D., Liang Y.L., Glukhova A., Venugopal H., Christopoulos A., Furness S.G.B., Miller L.J., Reedtz-Runge S., Langmead C.J., Gloriam D.E., Danev R., Sexton P.M., Wootton D. Differential GLP-1R Binding and Activation by Peptide and Non-peptide Agonists // *Mol Cell.* – 2020. – Vol. 80, No. 3. – P. 485–500.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.09.020
97. Zhao P., Liang Y.L., Belousoff M.J., Deganutti G., Fletcher M.M., Willard F.S., Bell M.G., Christie M.E., Sloop K.W., Inoue A., Truong T.T., Clydesdale L., Furness S.G.B., Christopoulos A., Wang M.W., Miller L.J., Reynolds C.A., Danev R., Sexton P.M., Wootton D. Activation of the GLP-1 receptor by a non-peptidic agonist // *Nature*. – 2020. – Vol. 577, No. 7790. – P. 432–436. DOI: 10.1038/s41586-019-1902-z
98. Freeman J.L.R., Dunn I.M., Valcarce C. Beyond topline results for the oral (non-peptide) GLP-1R agonist TTP273 in type 2 diabetes: how much and when // *Diabetol. Conf. 53rd Annu. Meet. Eur. Assoc. study diabetes, EASD 2017. Port.* – 2017. – Vol. 60. – P. S51-S52.
99. Girdhar K., Thakur S., Gaur P., Choubey A., Dogra S., Dehury B., Kumar S., Biswas B., Dwivedi D.K., Ghosh S., Mondal P. Design, synthesis, and biological evaluation of a small molecule oral agonist of the glucagon-like-peptide-1 receptor // *J Biol Chem.* – 2022. – Vol. 298, No. 5. – P. 101889. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101889
100. Karakasis P., Patoulas D., Pamporis K., Stachteas P., Bougioukas K.I., Klisic A., Fragakis N., Rizzo M. Safety and efficacy of the new, oral, small-molecule, GLP-1 receptor agonists orforglipron and danuglipron for the treatment of type 2 diabetes and obesity: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *Metabolism.* – 2023. – Vol. 149. – P. 155710. DOI: 10.1016/j.metabol.2023.155710
101. Bueno A.B., Sun B., Willard F.S., Feng D., Ho J.D., Wainscott D.B., Showalter A.D., Vieth M., Chen Q., Stutsman C., Chau B., Ficorilli J., Agejas F.J., Cumming G.R., Jiménez A., Rojo I., Kobilka T.S., Kobilka B.K., Sloop K.W. Structural insights into probe-dependent positive allosterism of the GLP-1 receptor // *Nat Chem Biol.* – 2020. – Vol. 16, No. 10. – P. 1105–1110. DOI: 10.1038/s41589-020-0589-7

102. King K., Lin N.P., Cheng Y.H., Chen G.H., Chein R.J. Isolation of Positive Modulator of Glucagon-like Peptide-1 Signaling from *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) Seed // *J Biol Chem.* – 2015. – Vol. 290, No. 43. – P. 26235–26248. DOI: 10.1074/jbc.M115.672097
103. Huthmacher J.A., Meier J.J., Nauck M.A. Efficacy and Safety of Short- and Long-Acting Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists on a Background of Basal Insulin in Type 2 Diabetes: A Meta-analysis // *Diabetes Care.* – 2020. – Vol. 43, No. 9. – P. 2303–2312. DOI: 10.2337/dc20-0498
104. Baggio L.L., Drucker D.J. Glucagon-like peptide-1 receptor co-agonists for treating metabolic disease // *Mol Metab.* – 2021. – Vol. 46. – P. 101090. DOI: 10.1016/j.molmet.2020.101090
105. Finan B., Yang B., Ottaway N., Smiley D.L., Ma T., Clemmensen C., Chabenne J., Zhang L., Habegger K.M., Fischer K., Campbell J.E., Sandoval D., Seeley R.J., Bleicher K., Uhles S., Riboulet W., Funk J., Hertel C., Belli S., Sebkova E., Conde-Knape K., Konkara A., Drucker D.J., Gelfanov V., Pfluger P.T., Müller T.D., Perez-Tilve D., DiMarchi R.D., Tschöp M.H. A rationally designed monomeric peptide triagonist corrects obesity and diabetes in rodents // *Nat Med.* – 2015. – Vol. 21, No. 1. – P. 27–36. DOI: 10.1038/nm.3761
106. Finan B., Ma T., Ottaway N., Müller T.D., Habegger K.M., Heppner K.M., Kirchner N., Holland J., Hembree J., Raver C., Lockie S.H., Smiley D.L., Gelfanov V., Yang B., Hofmann S., Bruemmer D., Drucker D.J., Pfluger P.T., Perez-Tilve D., Gidda J., Vignati L., Zhang L., Hauptman J.B., Lau M., Brecheisen M., Uhles S., Riboulet W., Hainaut E., Sebkova E., Conde-Knape K., Konkara A., DiMarchi R.D., Tschöp M.H. Unimolecular dual incretins maximize metabolic benefits in rodents, monkeys, and humans // *Sci Transl Med.* – 2013. – Vol. 5, No. 209. – P. 209ra151. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007218
107. Bech E.M., Voldum-Clausen K., Pedersen S.L., Fabricius K., Rudkjær L.C.B., Hansen H.H., Jelsing J. Adrenomedullin and glucagon-like peptide-1 have additive effects on food intake in mice // *Biomed Pharmacother.* – 2019. – Vol. 109. – P. 167–173. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.040
108. Decara J., Rivera P., Arrabal S., Vargas A., Serrano A., Pavón F.J., Dieguez C., Nogueiras R., Rodríguez de Fonseca F., Suárez J. Cooperative role of the glucagon-like peptide-1 receptor and β 3-adrenergic-mediated signalling on fat mass reduction through the downregulation of PKA/AKT/AMPK signalling in the adipose tissue and muscle of rats // *Acta Physiol (Oxf).* – 2018. – Vol. 222, No. 4. – P. e13008. DOI: 10.1111/apha.13008
109. Bojanowska E., Radziszewska E. Combined stimulation of glucagon-like peptide-1 receptor and inhibition of cannabinoid CB1 receptor act synergistically to reduce food intake and body weight in the rat // *J Physiol Pharmacol.* – 2011. – Vol. 62, No. 4. – P. 395–402.
110. Jouihan H., Will S., Guionaud S., Boland M.L., Oldham S., Ravn P., Celeste A., Trevaskis J.L. Superior reductions in hepatic steatosis and fibrosis with co-administration of a glucagon-like peptide-1 receptor agonist and obeticholic acid in mice // *Mol Metab.* – 2017. – Vol. 6, No. 11. – P. 1360–1370. DOI: 10.1016/j.molmet.2017.09.001
111. Elvert R., Bossart M., Herling A.W., Weiss T., Zhang B., Kannt A., Wagner M., Haack T., Evers A., Dudda A., Keil S., Lorenz M., Lorenz K., Riz M., Hennerici W., Larsen P.J. Team players or opponents: coadministration of selective glucagon and GLP-1 receptor agonists in obese diabetic monkeys // *Endocrinology.* – 2018. – Vol. 159, No. 8. – P. 3105–3119. DOI: 10.1210/en.2018-00399
112. Дружилов М. А., Кузнецова Т. Ю., Чумакова Г. А. Мульти-агонисты «инкретиновой оси» как перспективный инструмент управления кардиометаболическим риском при синдроме висцерального ожирения // *Российский кардиологический журнал.* – 2022. – Т. 27, № 4. – С. 4755. DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4755
113. Simonsen L., Lau J., Kruse T., Guo T., McGuire J., Jeppesen J.F., Niss K., Sauerberg P., Raun K., Dornonville de la Cour C. Preclinical evaluation of a protracted GLP-1/glucagon receptor co-agonist: Translational difficulties and pitfalls // *PLoS One.* – 2022. – Vol. 17, No. 3. – P. e0264974. DOI: 10.1371/journal.pone.0264974
114. van Witteloostuijn S.B., Dalbøge L.S., Hansen G., Midtgaard S.R., Jensen G.V., Jensen K.J., Vrang N., Jelsing J., Pedersen S.L. GUB06-046, a novel secretin/glucagon-like peptide 1 co-agonist, decreases food intake, improves glycemic control, and preserves beta cell mass in diabetic mice // *J Pept Sci.* – 2017. – Vol. 23, No. 12. – P. 845–854. DOI: 10.1002/psc.3048
115. Stensen S., Gasbjerg L.S., Helsted M.M., Hartmann B., Christensen M.B., Knop F.K. GIP and the gut-bone axis – Physiological, pathophysiological and potential therapeutic implications // *Peptides.* – 2020. – Vol. 125. – P. 170197. DOI: 10.1016/j.peptides.2019.170197
116. Del Prato S., Kahn S.E., Pavo I., Weerakkody G.J., Yang Z., Doupis J., Aizenberg D., Wynne A.G., Riesmeyer J.S., Heine R.J., Wiese R.J.; SURPASS-4 Investigators. Tirzepatide versus insulin glargine in type 2 diabetes and increased cardiovascular risk (SURPASS-4): a randomised, open-label, parallel-group, multicentre, phase 3 trial // *Lancet.* – 2021. – Vol. 398, No. 10313. – P. 1811–1824. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02188-7
117. Jastreboff A.M., Kaplan L.M., Frías J.P., Wu Q., Du Y., Gurbuz S., Coskun T., Haupt A., Milicevic Z., Hartman M.L.; Retatrutide Phase 2 Obesity Trial Investigators. Triple-Hormone-Receptor Agonist Retatrutide for Obesity – A Phase 2 Trial // *N Engl J Med.* – 2023. – Vol. 389, No. 6. – P. 514–526. DOI: 10.1056/NEJMoa2301972
118. Fosgerau K., Jessen L., Lind Tolborg J., Østerlund T., Schæffer Larsen K., Rolsted K., Brorson M., Jelsing J., Skovlund Ryge Neerup T. The novel GLP-1-gastrin dual agonist, ZP3022, increases β -cell mass and prevents diabetes in db/db mice // *Diabetes Obes Metab.* – 2013. – Vol. 15, No. 1. – P. 62–71. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2012.01676.x
119. Chodorge M., Celeste A.J., Grimsby J., Konkara A., Davidsson P., Fairman D., Jenkinson L., Naylor J., White N., Seaman J.C., Dickson K., Kemp B., Spooner J., Rossy E., Hornigold D.C., Trevaskis J.L., Bond N.J., London T.B., Buchanan A., Vaughan T., Rondinone C.M., Osbourn J.K. Engineering of a GLP-1 analogue peptide/anti-PCSK9 antibody fusion for type 2 diabetes treatment // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8, No. 1. – P. 17545. DOI: 10.1038/s41598-018-35869-4
120. Jain M., Carlson G., Cook W., Morrow L., Petrone M., White N.E., Wang T., Naylor J., Ambery P., Lee C., Hirshberg B. Randomised, phase 1, dose-finding study of MEDI4166, a PCSK9 antibody and GLP-1 analogue fusion molecule, in overweight or obese patients with type 2 diabetes mellitus // *Diabetologia.* – 2019. – Vol. 62, No. 3. – P. 373–386. DOI: 10.1007/s00125-018-4789-6

АВТОРЫ

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, директор Научно-образовательного института фармации им. К.М. Лакина, ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России; профессор кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: strannik986@mail.ru

Бакулин Дмитрий Александрович – кандидат медицинских наук, руководитель Межкафедрального научно-образовательного центра фармации, Научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина, ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-4694-3066. E-mail: mbfdoc@gmail.com

Морковин Евгений Игоревич – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией нейрпсихофармакологии НЦИЛС, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7119-3546. E-mail: e.i.morkovin@gmail.com

Петров Владимир Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической фармакологии и интенсивной терапии, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; главный внештатный специалист – клинический фармаколог Министерства здравоохранения РФ; заслуженный деятель науки РФ; заслуженный врач РФ. ORCID ID: 0000-0002-0258-4092. E-mail: brain@sprintnet.ru

Стрыгин Андрей Валерьевич – кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора НЦИЛС, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-6997-1601. E-mail: drumsav@mail.ru

Корянова Ксения Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-1571-9301. E-mail: kskor-16@mail.ru

Горбунова Юлия Васильевна – кандидат фармацевтических наук, заведующая лабораторией, Научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина, ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: yvgorbunova@yandex.ru

Колосов Юрий Анатольевич – кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора по учебной работе, Научно-образовательный институт

фармации им. К.М. Лакина, ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-1506-2565. E-mail: tronk79@gmail.com

Иванова Ольга Викторовна – кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник, Научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина, ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-4333-322X. E-mail: ovivanova134@mail.ru

Павлова Елизавета Валерьевна – младший научный сотрудник, Научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина, ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-0651-3205. E-mail: lizapavlova1609@yandex.ru

Джавахян Марина Аркадьевна – доктор фармацевтических наук, доцент, заместитель директора по внедрению и разработке, Научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина, ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-2673-6203. E-mail: akopovamarina13@mail.ru

Заборовский Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии, ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7923-9916. E-mail: azabor@mail.ru

Сапарова Валерия Бяшимовна – научный сотрудник, Научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина, ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-8445-1129. E-mail: Valeriya.Saparova@geropharm.com

Макаренко Игорь Евгеньевич – кандидат медицинских наук, научный сотрудник, Научно-образовательный институт фармации им. К.М. Лакина, ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России; руководитель медицинского департамента, ЗАО «Фарм-Холдинг». ORCID ID: 0000-0003-2308-0608. E-mail: Igor.Makarenko@geropharm.com

Драй Роман Васильевич – кандидат медицинских наук, директор ЗАО «Фарм-Холдинг». ORCID: 0000-0003-4594-6097. E-mail: roman.drai@geropharm.com

Чумаченко Анастасия Николаевна – студент-исследователь, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7756-3827. E-mail: nastya11386@icloud.com

