



УДК 615.276:616-073.756.8

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ ХОНОКИОЛА НА МОДЕЛИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА ПРИ РАЗРАБОТКЕ РАДИОЛИГАНДОВ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ

© 2026 г. К. И. Стосман*, К. В. Сивак*, **, Д. Д. Ваулина***, Н. Б. Викторов****,
М. М. Любишин*, Н. А. Гомзина***, #

* ФГБУ “Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева” Минздрава России,
Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17

** Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения
“Клиническая больница Святителя Луки”,
Россия, 194044 Санкт-Петербург, ул. Чугунная, 44к2

*** ФГБУН “Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой” РАН,
Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 9

**** Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет),
Россия, 190013 Санкт-Петербург, Московский просп., 26

Поступила в редакцию 04.07.2025 г.

После доработки 14.07.2025 г.

Принята к публикации 18.07.2025 г.

Неолигнаны хонокиол и 4'-O-метилхонокиол обладают, как известно, нейропротективной и противовоспалительной активностью. Ранее мы показали, что циклооксигеназа-2 (COX-2) может служить мишенью для структурных аналогов хонокиола (SAH) на модели нейровоспаления, вызванного липополисахаридом (ЛПС), а SAH, меченные ^{18}F ($T_{1/2} = 109.8$ мин), могут быть потенциальными радиолигандами для визуализации нейровоспаления с помощью позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ). В данной работе для оценки SAH впервые предложена модель ревматоидного артрита (РА) – хронического воспаления, приводящего к нейровоспалению. Лиганд 2-гидрокси-4'-(2-фторэтоксигруппы)-5-этоксигруппы-1,1'-бифенил (F-I) был выбран из трех SAH с фторэтоксигруппой для тестирования на модели РА, поскольку он имеет оптимальные биохимические параметры, отвечающие за его фармакокинетическое поведение *in vivo*. Эти параметры (липофильность, метаболическая стабильность и др.) определяли *in vitro* у радиофторированных SAH, полученных ^{18}F -фторэтированием предшественников с Вос-защитной группой. Модель РА индуцировали полным адьювантом Фрейнда (ПАФ). На модели РА у мышей линии C57BL/6 было показано, что F-I ингибировал периферическое воспаление (отек лапы) на ~30%, а нейровоспаление (повреждение нейронов), локализуемое преимущественно в ассоциативной коре мозга, – на ~60%. Первые результаты биораспределения ^{18}F -F-I у крыс Wistar с моделью РА, вызванного ПАФ, показали небольшое накопление радиоактивности в мозге по сравнению с интактной группой. Предварительное введение немеченого F-I или целекоксиба привело к снижению поглощения ^{18}F -F-I, что, возможно, свидетельствует о специфическом связывании с COX-2. Оценка биологической активности SAH на модели РА способствует пониманию механизмов воспаления и открывает путь к разработке новых противовоспалительных средств и ПЭТ-радиотрейсеров для визуализации нейровоспаления.

Ключевые слова: структурные аналоги хонокиола, нейровоспаление, модель адьювантного артрита, позитронная эмиссионная томография, радиолиганд, фтор-18, циклооксигеназа-2

DOI: 10.7868/S1998286026010013

Сокращения: COX – циклооксигеназа; PPB – связывание с протеинами плазмы; SAH – структурные аналоги хонокиола; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ЛПС – липополисахарид; ПАФ – полный адьювант Фрейнда; ПЭТ – позитронная эмиссионная томография; РА – ревматоидный артрит.

Автор для связи: (тел.: +7 (921) 747-76-94; эл. почта: gomzina@ihb.spb.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Нейровоспаление – ответ иммунокомпетентных клеток (микроглии и астроцитов) центральной нервной системы (ЦНС) на нарушение гомеостаза нервной ткани. Активация этих клеток характеризуется широким спектром фенотипов, которые при хронических неврологических и нейродегенеративных заболеваниях могут меняться от нейропротекторных до нейротоксических [1]. При хронической форме нейровоспаления возрастающая продукция микроглией провоспалительных цитокинов, экспрессия интегринов и высокая активность ферментов может привести к повреждению и гибели нейронов. Доказано, что нейровоспаление играет ключевую роль в развитии таких заболеваний, как церебральная ишемия, болезни Альцгеймера и Паркинсона, эпилепсия, шизофрения и т.д. [2].

В качестве биомаркера для диагностики и терапии нейровоспаления большое значение имеют белки-рецепторы, локализованные в определенной области мозга, экспрессия которых в активированной микроглии во много раз отличается от их экспрессии в гомеостазе. Важнейшие из них – ферменты циклооксигеназа (COX-1 и COX-2) и липоксигеназа (LOX-5 и LOX-15), способствующие превращению арахидоновой кислоты в простагландины и лейкотриены, каннабиноидные рецепторы CB1 и CB2, рецептор колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R), пуринергические рецепторы P2X7R и P2YR12 [3]. Наиболее изученный биомаркер – COX-2. Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), разработанные на основе селективных ингибиторов COX-2 (коксибов), снижают риск развития заболеваний, связанных с воспалением, но имеют серьезные побочные эффекты (кардиоваскулярные и гастроинтестинальные риски). Поэтому поиск новых лигандов-ингибиторов COX-2, в том числе на основе природных соединений, чрезвычайно актуален.

Альтернативой клинически используемым коксибам могут быть производные природных полифенольных и пиримидиновых соединений, поскольку последние обладают ярко выраженной противовоспалительной и антиоксидантной активностью при отсутствии серьезных побочных эффектов [4, 5]. Позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) предоставляет уникальные возможности для визуализации нейроиммунных реакций *in vivo* в ЦНС с помощью радиолигандов, имеющих высокое сродство к перечисленным биомаркерам, и тем самым позволяет оценить вклад этих маркеров в процесс нейровоспаления [1]. Это дает возможность активно использовать метод ПЭТ как в изучении механизмов нейровоспаления при

различных заболеваниях, так и в разработке новых противовоспалительных средств. В последние годы при поиске новых ПЭТ-радиолигандов для визуализации нейровоспаления исследователи все чаще обращают внимание на природные полифенольные соединения и их производные [6]. Например, производные флавоноидов и стилибенов, меченные ПЭТ-радионуклидами (^{18}F , ^{11}C и ^{68}Ga), – перспективные радиотрейсеры для визуализации патологических белковых агрегатов (амилоидных бляшек, τ -белка и α -синуклеина), образование которых связывают с хроническим нейровоспалением при болезнях Альцгеймера и Паркинсона [7, 8].

Многочисленные фармакологические исследования показывают, что полифенольные неолигнаны, такие как магнолол, хонокиол и 4'-О-метилхонокиол (схема 1), получаемые из коры магнолии (*Magnolia officinalis*), а также многие их синтетические производные обладают выраженной нейропротективной и противовоспалительной активностью, выступая потенциальными ингибиторами COX-2 [4]. Ранее нами впервые были предложены структурные аналоги хонокиола (SAH), в том числе меченные изотопами ^{11}C ($T_{1/2} = 20.4$ мин) и ^{18}F ($T_{1/2} = 109.8$ мин), в качестве потенциальных ПЭТ-радиолигандов к COX-2 [9–11]. Изучение биораспределения SAH в органах и тканях крыс линии Wistar с моделью нейровоспаления, вызванного липополисахаридом (ЛПС), показало, что они легко преодолевают гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и накапливаются в отделах мозга, в которых экспрессируется COX-2. Вытеснение радиолигандов из этих отделов мозга целекоксибом, селективным ингибитором COX-2, может свидетельствовать о специфичном связывании SAH с этим ферментом [10, 11]. Также было показано, что небольшая модификация структуры SAH, например, замена метокси- на фторэтоксигруппу (MPbP и F-IV, схема 1), приводила к значительному изменению фармакокинетического поведения [11]. Так, [^{11}C]MPbP быстро распределялся в организме крыс и быстро выводился почками (10–20 мин), а радиолиганд [^{18}F]F-IV, напротив, показал высокий уровень активности в крови, почти не снижающийся в течение 2 ч, что может быть серьезным препятствием при визуализации очагов воспаления. В то же время радиофторированные препараты, благодаря более длительному периоду полураспада ^{18}F , обладают значительными преимуществами перед препаратами, меченными изотопом ^{11}C . К их числу относится возможность проведения сложных многостадийных синтезов и длительных процедур тестирования при использовании невысокой начальной активности.

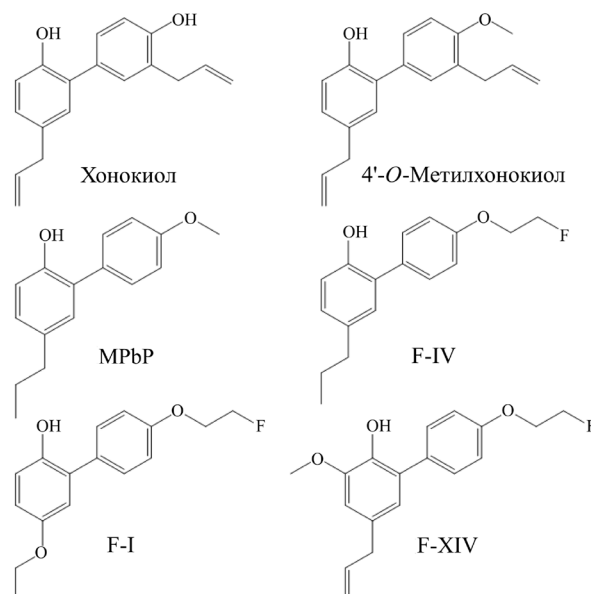


Схема 1. Хонокиол, 4'-*O*-метилхонокиол и структурные аналоги хонокиола (SAN): 2-гидрокси-4'-метокси-5-пропил-1,1'-бифенил (MPbP), 2-гидрокси-5-пропил-4'-(2-фторэтокс)-1,1'-бифенил (F-IV), 2-гидрокси-4'-(2-фторэтокс)-5-этокс-1,1'-бифенил (F-I) и 5-аллил-2-гидрокси-3-метокси-4'-(2-фторэтокс)-1,1'-бифенил (F-XIV).

Закономерное продолжение проекта по разработке агентов для ПЭТ-визуализации нейровоспаления на основе SAN, вдохновленного результатами тестов противовоспалительной активности фторэтоксипроизводных бифенила на ЛПС-модели нейровоспаления [11], – изучение и оценка этих производных на моделях широко распространенных заболеваний, приводящих к хроническому нейровоспалению. В данной работе мы использовали модель ревматоидного артрита (РА), индуцированного полным адьювантом Фрейнда (ПАФ), для предварительной оценки SAN. Эта модель по клиническому течению, патологическим и гистологическим изменениям близка к РА человека – хроническому аутоиммунному и системному воспалительному заболеванию, которое вызывает необратимые повреждения суставов [12, 13]. Периферическое воспаление при РА может приводить к активации микроглии и астроцитов в ЦНС и вызывать нейровоспаление, приводящее к болевым ощущениям, депрессии и когнитивным нарушениям. Модель РА часто используется для оценки противовоспалительной активности различных соединений, в том числе лекарственных средств. Кроме того, известно, что при воспалительных заболеваниях суставов, таких как РА и остеоартрит, в синовиоцитах наблюдается повышенная экспрессия COX-2. Недавно были успешно проведены первые клинические исследования [^{11}C]MC1, нового перспективного радиолиганда к COX-2, направленные на ПЭТ-

визуализацию РА [14]. ПЭТ позволяет *in vivo* оценить вклад конкретных белковых мишеней, регуляция которых возрастает при нейровоспалении и РА, таких как транслокаторный белок 18 кДа (TSPO) и COX-2, а также проводить мониторинг терапевтических воздействий на эти мишени и предсказывать результаты лечения [15].

Следует отметить, что в последние годы особенно интенсивно изучается взаимосвязь периферического воспаления и нейровоспаления, основная цель при этом – открытие новых терапевтических подходов, нацеленных одновременно на оба процесса [16]. Наличие связи между РА и нейровоспалением было убедительно показано на примере радиолиганда [^{11}C]MC1, с помощью которого успешно визуализировали повышенную экспрессию COX-2 не только в суставах пациентов с РА, но и в мозге, а накопление радиолиганда количественно блокировалось цеlexоксибом [14].

Цель данной работы – оценка биологической активности SAN на модели РА на примере F-I и его радиофторированного аналога [^{18}F]F-I, синтезированного впервые.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор радиолиганда. Соединение F-I было выбрано для тестирования противовоспалительной активности на модели РА в результате сравнения биохимических параметров трех SAN, содержащих 4'-фторэтоксигруппу в одном аромати-

ческом кольце и различающихся радикалом в положении 5 другого кольца: F-I (OEt), F-IV (Pr), F-XIV (Allyl) (схема 1). Соединения F-I и F-IV были получены, как описано в работах [11] и [9], соединение F-XIV синтезировано впервые согласно схеме 2.

Фармакокинетическое поведение соединений в организме экспериментальных животных во многом определяют такие биохимические свойства, как липофильность, проницаемость ГЭБ пассивной диффузией, стабильность и связывание с белками плазмы. Параметры, характеризующие эти свойства, определяли с использованием меченных изотопом ^{18}F радиолигандов [^{18}F]F-I, [^{18}F]F-IV и [^{18}F]F-XIV в радиометрических тестах

in vitro, которые считаются “золотым” стандартом при работе с ультрамалыми концентрациями веществ, в частности для их обнаружения в плазме крови. Данные тестов приведены в табл. 1. Вычисленные значения были получены при расчете фармакокинетических свойств ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) SAN на сайте <https://preadmet.qsarhub.com/>. Расчеты ADME – общепринятый подход к отбору структур с подходящими свойствами для кандидатов в лекарственные препараты [17]. Использование расчетных данных в биологических испытаниях, как правило, существенно уменьшает трудоемкость радиоактивных экспериментов.

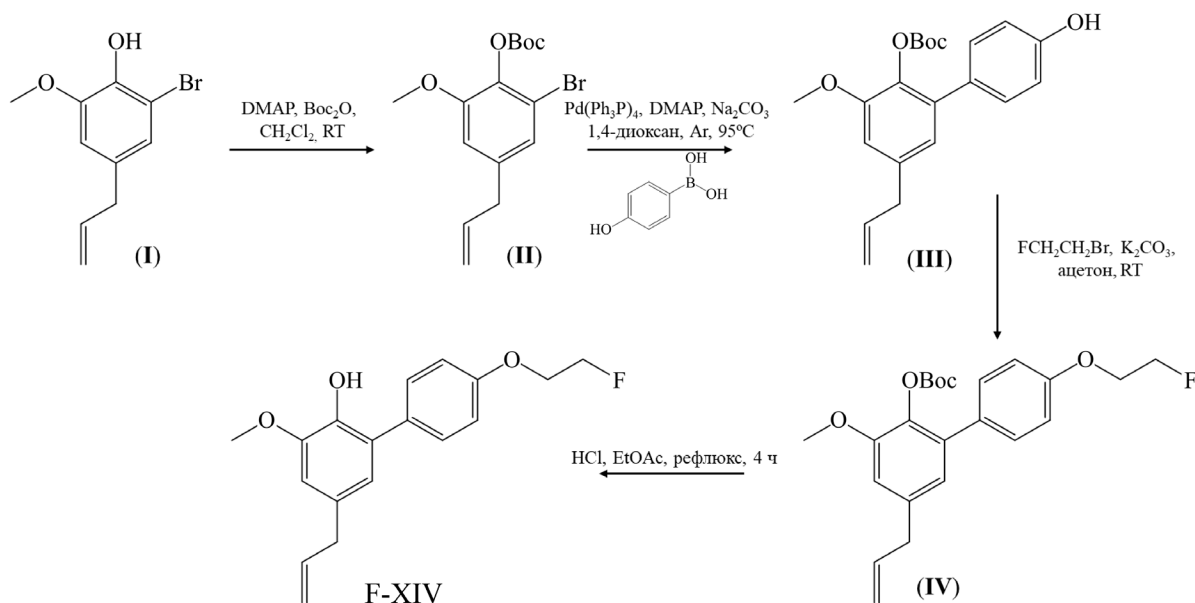


Схема 2. Синтез структурного аналога хонокиола F-XIV.

Таблица 1. Некоторые биохимические параметры структурных аналогов хонокиола

Соединение	Липофильность		Проницаемость ГЭБ		Связывание с протеинами плазмы, %	
	вычисл. $\log P$	эксп. $\log D_{7.4}$	$\log BB$ вычисл.	эксп.	вычисл.	эксп. (крысы)
4'-O-метилхонокиол	4.8	—	3.1	+	92.8	не опред.
MPbP	4.0	2.5 ± 0.1	1.6	+	91.1	92.3
Хонокиол	4.4	4.3 ± 0.1	1.6	+	93.1	не опред.
F-I	2.5	1.7 ± 0.1	0.5	+	97.4	97.7
F-IV	4.4	3.3 ± 0.1	2.2	+	91.2	98.0
F-XIV	2.9	2.1 ± 0.1	0.5	не опред.	100	99.8

Радиолиганды [^{18}F]-I, [^{18}F]-IV и [^{18}F]-XIV были получены [^{18}F]фторэтилизацией молекул с защитной Вос-группой с последующим ее удалением (схема 3). Радиосинтез [^{18}F]-IV был описан в работе [11], а радиолиганды [^{18}F]-I и [^{18}F]-XIV получены впервые. При этом полупрепаративная ВЭЖХ-очистка была заменена на твердофазную экстракцию на картридже с обращенной фазой (C18) с последующим фракционным элюированием продукта растворами этанола с возрастающей концентрацией. Оптимизация значительно упростила процедуру синтеза, уменьшила потери продукта и ощутимо сократила время синтеза (в 2 раза по сравнению с ВЭЖХ-очисткой) при сохранении высокой радиохимической (>95%) и химической чистоты (содержание примесей <1 мкг/мл).

По данным радио-ТСХ, все изученные радиолиганды были стабильны в плазме человека по отношению к дерадифторированию на 90–92% по крайней мере в течение 60 мин, при этом других радиоактивных соединений обнаружено не было. Можно ожидать, что измеренная активность органов при биораспределении будет обусловлена радиолигандом, а не его радиометаболитами.

Как известно, липофильность соединений определяется логарифмом коэффициента распределения вещества в системе 1-октанол/вода ($\log P$) или в системе 1-октанол/буфер, pH 7.4 ($\log D_{7.4}$). По правилам Липинского (Lipinski rule of five) для рецепторных лигандов эта величина должна быть ≤ 5 [18]. Высокая липофильность может служить препятствием для проникновения через ГЭБ, а также способствовать высокому неспецифическому связыванию. Связывание с белками плазмы (PPB, protein plasma binding) – вид неспецифического связывания, поскольку только несвязанная (свободная) фракция лиганда в крови фармаколо-

гически активна и может связываться с выбранной мишенью. Для рецепторного лиганда наиболее оптимально, когда свободная фракция составляет не менее 5–10% от всей введенной активности. Высокое значение PPB (>99%) может быть причиной высокого фонового уровня радиоактивности в крови и маскировать накопление радиолиганда, обусловленное его связыванием с мишенью [19]. Экспериментальное определение $\log D_{7.4}$ и PPB проводили радиометрическими методами “встряхивания” (shake-flask) и ультрафильтрации соответственно [20, 21]. Расчетная величина $\log BB$ характеризует проницаемость ГЭБ, определяется логарифмом отношения стационарных концентраций лиганда в мозге и крови, ($\log BB = \log[\text{мозг}]/[\text{кровь}]$). Считают, что лиганды с $\log BB \geq 0.3$ легко проходят ГЭБ пассивной диффузией [22]. Проницаемость ГЭБ для SAN из табл. 1 экспериментально была определена ранее в скрининге противовоспалительной активности [11], а экспериментальные данные для хонокиола взяты из работы [23].

Как видно из данных таблицы, все соединения легко диффундируют через ГЭБ. Экспериментальные значения $\log D_{7.4}$ и вычисленные значения $\log P$ сильно различаются для некоторых SAN. Хотя все фторэтоксипроизводные бифенила имеют $\log D_{7.4} < 5$, F-IV из них наиболее липофилен. Экспериментальные значения PPB близки к вычисленным для всех SAN, для F-XIV высокое значение параметра (>99%) – препятствие для его испытаний на модели артрита. Таким образом, из трех кандидатов соединение F-I обладает наиболее оптимальными параметрами для использования в исследованиях модели артрита, индуцированного ПАФ, воспроизводимой на экспериментальных животных.

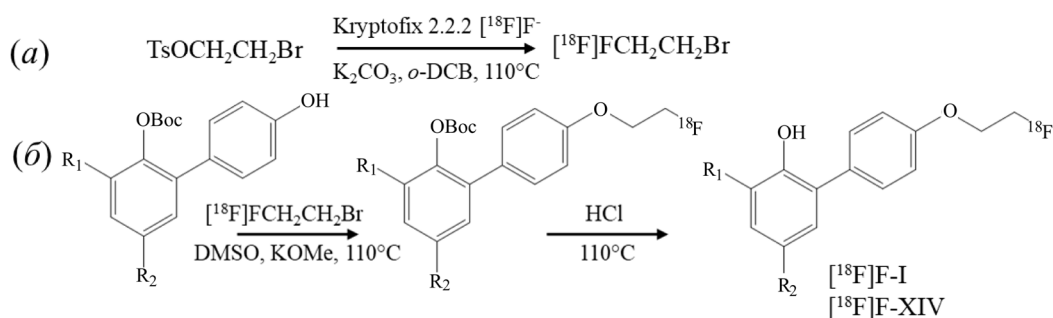


Схема 3. Получение 2-гидрокси-4'-(2-[^{18}F]фторэтоксид)-5-этоксид-1,1'-бифенила ([^{18}F]-I) $R_1 = \text{H}$ и $R_2 = \text{OEt}$ и 5-аллил-2-гидрокси-3-метоксид-4'-(2-[^{18}F]фторэтоксид)-1,1'-бифенила ([^{18}F]-XIV), $R_1 = \text{OMe}$ и $R_2 = \text{Allyl}$. (a) – Синтез меченного ^{18}F фторэтилирующего агента; (б) – синтез радиолигандов.

Тестирование F-I и его радиоактивного аналога на модели РА, индуцированного ПАФ.

Артрит, вызванный полным адьювантом Фрейнда (ПАФ), представляет собой хроническое воспаление, характеризующееся двумя фазами: острая фаза (с 1-го дня) с местными воспалительными реакциями, которые приводят к первичным артритным поражениям, таким как отек, эритема на инъекционной лапе и хроническая воспалительная фаза (с 15-го дня) с вторичными артритными поражениями на контрлатеральной лапе. Обычно через 14 дней после введения ПАФ у животных наблюдаются признаки артрита (деформация конечностей, изменение суставного аппарата) [24]. При изучении противовоспалительной активности F-I на модели РА, индуцируемого ПАФ, были поставлены две основные задачи: оценка способности F-I ингибировать периферическое воспаление (уменьшение отека лапы) и оценка протективного эффекта F-I при нейровоспалении, вызванного артритом.

В нашем исследовании показано, что введение мышам линии C57BL/6 F-I в дозе 10 мг/кг ежедневно, с 7-х по 20-е сутки после инъекции ПАФ, позволило снизить воспалительную реакцию, уменьшив величину отека лапы на ~30% (рис. 1).

Хроническое воспаление, вызванное ПАФ, оказывая длительное воздействие на мозг, способствует развитию нейровоспаления и повреждению нейронов. Для оценки нейропротективного действия F-I на гиппокамп и ассоциативную кору как наиболее уязвимые для нейровоспаления отделы мозга [25] мы провели сравнительный гистоморфологический анализ срезов мозга мышей с моделью

РА и с воспалением, моделированным ЛПС, самой распространенной моделью нейровоспаления, воспроизводимой на мелких лабораторных животных [26] (рис. 2). У мышей с ЛПС-индуцированным воспалением во всех анализируемых участках мозга наблюдалось снижение линейной плотности нейронов, повреждение нейронов, характеризующиеся уменьшением размеров клеток с изменением тинкториальных свойств цитоплазмы и гиперконденсацией ядерного хроматина. Число пикнотичных нейронов у особей с патологией существенно (в 2–3 раза) превышало их число у интактных животных как в коре, так и в гиппокампе. А трехкратное введение F-I мышам позволило уменьшить число поврежденных нейронов и в полях гиппокампа, и в ассоциативной коре на 30–40%. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными, которые показали, что метокси- и фторэтоксипроизводные SAN проявляют нейропротективные свойства в гиппокампе и коре у мышей с воспалением, индуцированным ЛПС [9, 11].

У мышей на 20-е сутки после субплантарного введения ПАФ число пикнотично измененных нейронов в коре было в 5 раз выше, чем у интактных особей, а двухнедельное введение F-I позволяло снизить его более чем на 60%. В гиппокампе при этом не наблюдали значимых различий между группами. Таким образом, в данной модели РА нейропротективный эффект F-I наиболее ярко был выражен в ассоциативной коре мозга, нейроны которой претерпевали наибольшие повреждения при нейровоспалении.

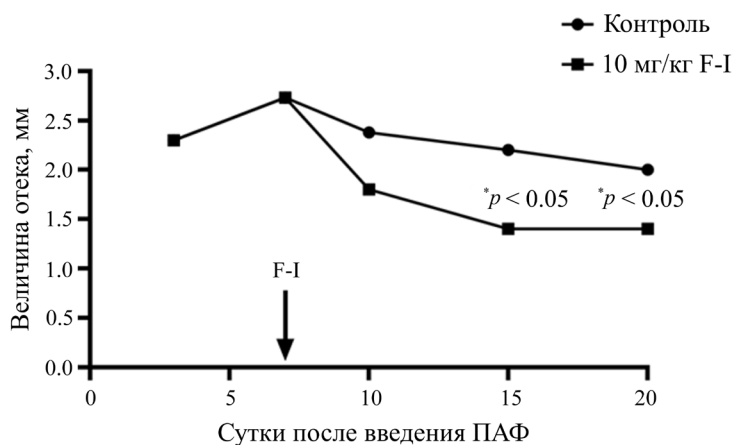


Рис. 1. Динамика развития адьювантного артрита у мышей C57BL/6 в зависимости от времени (стрелка указывает на начало введения F-I).

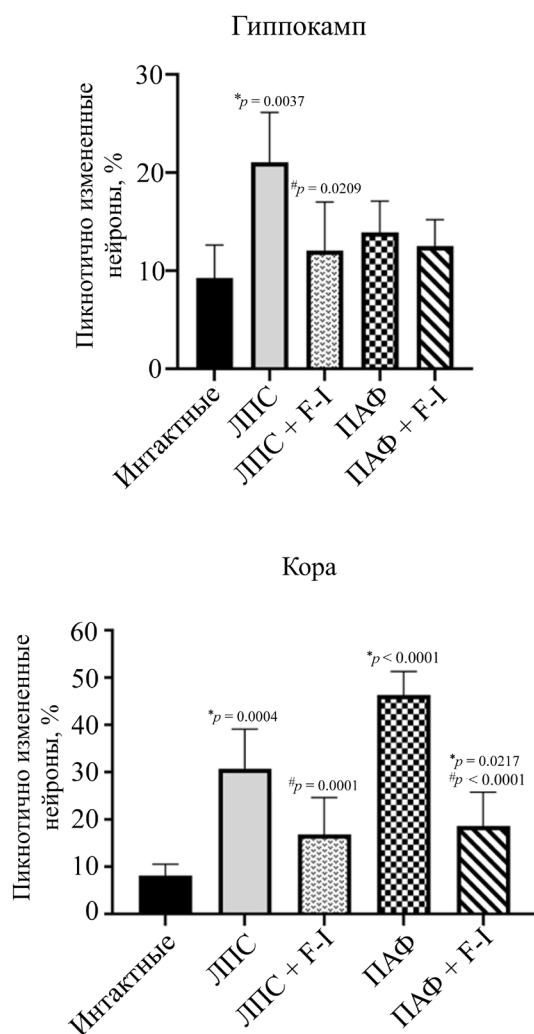


Рис. 2. Результаты гистоморфологического анализа срезов мозга мышей C57BL/6. Сравнение эффекта введения F-I на число пикнотически поврежденных нейронов при нейровоспалении, вызванном ЛПС и ПАФ. Отмечены статистически значимые различия: * – по сравнению с интактной группой; # – по сравнению с группой контроля патологии (ЛПС или ПАФ).

Результаты гистоморфологического анализа позволяют предположить, что нейровоспаление в двух рассмотренных моделях системного воспаления локализуется в разных регионах мозга: в ЛПС-модели – в гиппокампе и в ассоциативной коре, а в модели РА, вызванного введением ПАФ, – только в коре. Этим феноменом, по-видимому, и можно объяснить избирательность нейротективного поведения F-I в мозге мышей с РА, вызванным ПАФ. Механизмы, связывающие системное воспалительное заболевание и активацию микроглии, остаются малоизученными, но можно

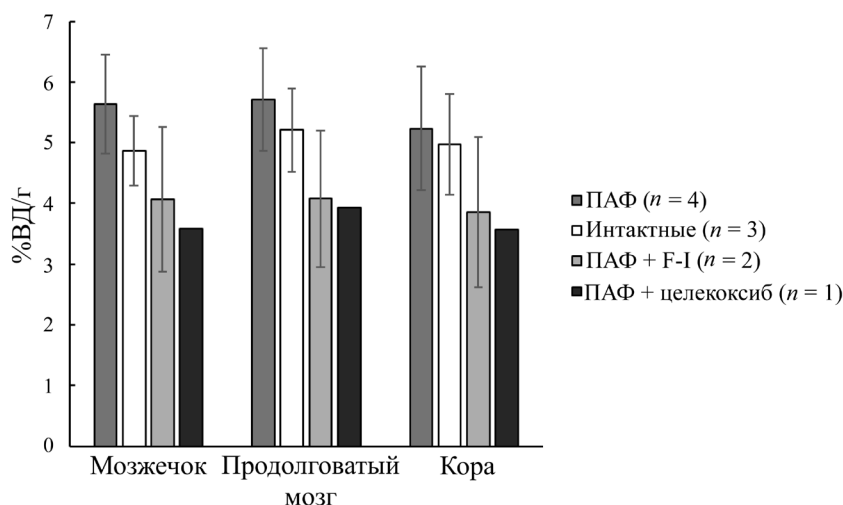
предположить, что причина такой локализации нейровоспаления в модели РА – в ином пути передачи периферического воспаления мозгу, чем в ЛПС-модели. Например, в работе [27] авторы рассматривают различное аккумуляирование нейровоспаления в гиппокампе и коре в зависимости от преобладания лимфоидного или миелоидного иммунофенотипа в модели РА, обусловленного первичной активацией лимфоцитов и миелоидных клеток (моноцитов) соответственно. При переносе воспаления мозгу и в лимфоидном, и в миелоидном подтипах артрита наблюдали активацию микроглии, астроцитов и периваскулярных макрофагов, но в лимфоидной модели РА, индуцированной коллагеном, эти изменения в основном наблюдались в коре и гиппокампе, а в трансгенной модели мышей с человеческим TNF- α (hTNFtg) (миелодный подтип) наблюдалось отчетливое распределение нейровоспаления на кору, стриатум и таламус, не затрагивая при этом гиппокамп и мозжечок. Возможно, наличие нейровоспаления в коре и отсутствие его в гиппокампе мозга мышей с моделью РА, вызванного введением ПАФ, также связано с миелоидным путем передачи воспаления. Транскриптомные исследования подтвердили существование подобных иммунофенотипов с лимфоидным и миелоидным путем передачи воспаления у пациентов с РА, причем лимфоидный подтип связан с более быстрым прогрессированием и более тяжелой формой заболевания [28]. Детальное изучение связи локации нейровоспаления с иммунофенотипом РА, безусловно, поможет при прогнозировании и своевременном лечении заболевания.

Изучение *ex vivo* биораспределения [^{18}F]F-I на крысах линии Wistar проводили на 15-й день моделирования адъювантного артрита (начало хронической фазы). Первые результаты позволили утверждать, что радиолиганд проходит через ГЭБ и накапливается в мозге (табл. 2, рис. 3). О наличии системного воспаления в модели патологии может свидетельствовать повышенное накопление радиолиганда в сердце, легких и почках – органах, в которых наряду с мозгом, как известно, экспрессируется СОХ-2. Основной путь выведения [^{18}F]F-I, как и ранее изученного [^{18}F]F-IV, проходит через почки и мочевой пузырь. Значимого различия между распределением радиолиганда [^{18}F]F-I в органах интактных особей по сравнению с органами животных с патологией выявлено не было (табл. 2). В трех отделах мозга наблюдалось незначительное повышение накопления радиолиганда у животных с патологией по срав-

Таблица 2. Биораспределение по органам и тканям крыс линии Wistar радиолиганда [^{18}F]F-I через 45 мин после введения

Орган/ткань	Биораспределение, % ВД/г	
	ПАФ ($n = 4$)	Интактная группа ($n = 3$)
Кровь	9.5 ± 1.3	8.9 ± 1.0
Мозжечок	5.6 ± 0.8	4.9 ± 0.6
Продолговатый мозг	5.7 ± 0.9	5.2 ± 0.7
Кора	5.2 ± 1.0	5.0 ± 0.8
Сердце	8.1 ± 2.9	6.6 ± 0.7
Легкие	7.3 ± 1.8	6.9 ± 1.1
Печень	11.7 ± 3.9	11.0 ± 2.0
Почки	9.7 ± 2.0	9.1 ± 1.7
Селезенка	5.8 ± 0.9	5.3 ± 0.8
Мочевой пузырь	15.0 ± 4.9	29.9 ± 7.5
Мышца	4.5 ± 0.6	3.8 ± 1.0

Примечание: биораспределение представлено в % ВД/г (введенная доза на 1 г ткани).

**Рис. 3.** Биораспределение [^{18}F]F-I по отделам мозга крыс линии Wistar с моделью адьювантного артрита и интактных животных через 45 мин после введения (%ВД/г – введенная доза на грамм ткани).

нению с интактными. Однако при предварительном введении животным с РА немеченого лиганда F-I или целекоксиба (опыты с “вытеснением”) наблюдалось снижение накопления [^{18}F]F-I, что может свидетельствовать о специфическом связывании радиолиганда с СОХ-2 [29] (рис. 3). Значительная ингибирующая активность F-I в отношении СОХ-2 была подтверждена нами ранее расчетами относительной свободной энергии (ddG) связывания его с ферментом [11].

Биораспределение [^{18}F]F-I не показало повышенного накопления радиолиганда в коре мозга индуцированных ПАФ крыс, которое могло бы свидетельствовать о локализации нейровоспаления в этом отделе мозга (по аналогии с мышами). Возможно, для развития хронического иммунного воспаления у крыс с ПАФ-индуцированной моделью патологии прошло недостаточно времени (14 дней от начала моделирования артрита). Поэтому в будущих исследованиях планируется перед изучением биораспределения радиолиганда

анализировать в синовиальной жидкости уровень TNF- α как маркера воспаления. Разницу в накоплении радиолиганда в мозге интактных животных и особей, которым вводили ПАФ, можно увеличить, если минимизировать мешающий фактор РРВ, из-за которого, по-видимому, наблюдается высокий уровень радиоактивности в крови. Это можно сделать, проводя перфузию органов физиологическим раствором. Процедура часто используется при оценке радиотрейсеров для ЦНС.

Следует подчеркнуть, что в работе на примере [^{18}F]F-I приведены самые первые (пилотные) результаты изучения распределения САН в органах и тканях крыс с моделью хронического иммунного воспаления. В дальнейшем будет продолжена разработка новых меченных ^{11}C и ^{18}F САН с улучшенными биохимическими характеристиками, в частности с более низким РРВ, с более высокой специфичностью и селективностью к СОХ-2. Ранее нами было показано, что для лиганда F-IV, близкого по структуре к F-I, полумаксимальная ингибирующая концентрация, определяющая специфичность к СОХ-2 (СОХ-2 IC₅₀), не намного меньше СОХ-2 IC₅₀ для целекоксима (0.09 мкМ против 0.05 мкМ). Но селективность к СОХ-2, определяемая отношением СОХ-1 IC₅₀/СОХ-2 IC₅₀, в 4–5 раз меньше, чем для целекоксима [11] и на много порядков меньше, чем для одобренного для клинического применения МС1 [14]. Новые структуры САН будут образованы добавлением к каркасу алкоксибифенила (F-I) арилсульфоновой группы. Очень многие эффективные ингибиторы СОХ-2 (целекоксиб, рофекоксиб, МС1) и радиолиганды на их основе имеют эту фармакофорную группу, которая, по-видимому, служит общим функциональным фрагментом для предпочтительного связывания с СОХ-2. Проведенный нами молекулярный дизайн, основанный на молекулярном моделировании и докинге *in silico*, доказал это, позволив выбрать из почти сотни соединений САН несколько потенциально наиболее эффективных ингибиторов СОХ-2 с арилсульфоновой группой. Расчеты показали, что эти лиганды демонстрируют высокий уровень связывания с СОХ-2 (как минимум на уровне известных ингибиторов) и при этом превосходят последних по селективности, имеют оптимальную липофильность ($\log P < 4$) и РРВ $< 90\%$. В настоящее время разрабатывается достаточно трудоемкий синтез этих новых соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение САН. Все коммерчески доступные реагенты использовали без дополнительной очистки. Температуры плавления определяли с помощью прибора Кофлера (VEB Wägetechnik Rapido, РНМК 81/2969). Колоночную хроматографию проводили с использованием силикагеля Merck 60 (0.035–0.070 мм, Acros, Германия) с указанными элюентами, аналитическую тонкослойную хроматографию (ТСХ) – на пластинах силикагеля Merck 60 F₂₅₄ (Германия) с УФ-визуализацией (254 нм). Все манипуляции с материалами, чувствительными к кислороду и влаге, проводили в атмосфере сухого аргона. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Avance 400 (Bruker, Германия) в CDCl₃ (^1H , ^{13}C и ^{19}F при 400.17, 100.62 и 376.54 МГц соответственно). Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на спектрометре microOTOF (Bruker, Германия) в режиме электроспрей-ионизации (ESI). Ключевая стадия синтеза соединений F-I, F-IV и F-XIV – реакция кросс-сочетания Судзуки–Мияура арилгалогенидов и 4-гидроксифенилбороновой кислоты, катализируемая тетраakis(трифенилфосфин)палладием (0). Синтезы F-I и F-IV описаны в работах [11] и [9] соответственно, соединение F-XIV получено впервые (схема 2).

2-Гидрокси-4'-(2-фторэтоксигруппы)-5-этоксигруппы-1,1'-бифенил (F-I). Твердое белое вещество, т. пл. 88–89°C. ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl₃; δ , м.д.): 1.42 т (3H, J 7.2, CH₃), 4.03 кв (2H, J 7.2, CH₂O), 4.28 дм (2H, $^3J_{\text{HF}}$ 28, CH₂O), 4.40–4.60 уш.с (1H, OH), 4.80 дм (2H, $^2J_{\text{HF}}$ 47, CH₂F), 6.77–6.95 м (3H, H-3, H-4, H-6), 7.06 д (2H, J 8.8), 7.43 (2H, J 8.8). ^{13}C -ЯМР (101 МГц, CDCl₃; δ , м.д.): 15.0, 64.2, 67.2 д ($^2J_{\text{CF}}$ 20, OCH₂), 81.0 д ($^1J_{\text{CF}}$ 170, FCH₂), 114.9, 115.3, 116.2, 116.5, 128.3, 130.1, 130.3, 146.5, 152.9, 158.1. ^{19}F -ЯМР (376.5 МГц, CDCl₃; δ , м.д.): –223.7. HRMS(ESI): m/z , $[M + \text{Na}]^+$, вычислено для C₁₆H₁₇FO₃: 299.1054; найдено: 299.1060.

2-Гидрокси-5-пропил-4'-(2-фторэтоксигруппы)-1,1'-бифенил (F-IV). Бесцветное масло. ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl₃; δ , м.д.): 1.01 т (3H, J 7.2, CH₃), 1.70 м (2H, CH₂CH₃), 2.60 м (2H, ArCH₂), 4.30 дм (2H, $^3J_{\text{HF}}$ 28, OCH₂), 4.82 дм (2H, $^2J_{\text{HF}}$ 47, FCH₂), 5.16 уш.с (1H, OH), 6.93 д (1H, J 8.8), 7.06–7.11 м (4H), 7.46 д (2H, J 8.8, 2CH_{Ar}). ^{13}C -ЯМР (101 МГц, CDCl₃; δ , м.д.): 13.9, 24.8, 37.3, 67.3 д ($^2J_{\text{CF}}$ 20, OCH₂), 82.0 д ($^1J_{\text{CF}}$ 170, FCH₂), 115.3,

115.6, 127.4, 128.8, 130.2, 130.3, 130.4, 135.0, 150.5, 158.1. ^{19}F -ЯМР (376.5 МГц, CDCl_3 ; δ , м.д.): –223.6. HRMS(ESI): m/z , $[M + \text{Na}]^+$, вычислено для $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{FO}_2$: 297.1261; найдено: 297.1273.

5-Аллил-2-гидрокси-3-метокси-4'-(2-фторэтокси)-1,1'-бифенил (F-XIV) получен из 2-бром-4-аллилфенола (**I**) в четыре стадии (схема 2).

4-Аллил-6-бром-2-метоксифенил-трет-бутилкарбонат (II). 4-Диметиламинопиридин (0.01 г, 0.8 ммоль) добавляли при перемешивании к раствору 4-аллил-6-бром-2-метоксифенола (**I**) (1.10 г, 4.52 ммоль) и Woc_2O (1.05 г, 4.81 ммоль) в 20 мл дихлорметана. Через 15 ч при 20°C раствор промыли 1 н. NaOH (2 × 20 мл), затем водой (20 мл) и сушили Na_2SO_4 . После удаления растворителя в вакууме получили соединение (**II**) (1.45 г, выход 94%, светло-желтое масло), которое использовали далее без очистки. ^1H -ЯМР (400 МГц; CDCl_3 ; δ , м.д.): 1.55 с (9H, t-Bu), 3.33 д (2H, J 6.7, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.82 с (3H, CH_3O), 5.09 м (1H, $=\text{CHH}$), 5.12 м (1H, $=\text{CHH}$), 5.90 м (1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.71 д (1H, J 1.8, C^3H), 7.10 д (1H, J 1.8, C^5H). ^{13}C -ЯМР (101 МГц, CDCl_3 ; δ , м.д.): 27.63 ($(\text{CH}_3)_3$), 39.85 (CH_2), 56.27 (CH_3O), 83.88 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 111.93 (C^3), 116.86 ($=\text{CH}_2$), 117.05, 124.29 (C^5), 136.32 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 136.41, 139.73 (C^4), 150.65 ($\text{C}=\text{O}$), 152.48 (C^2). HRMS(ESI): m/z , $[M + \text{Na}]^+$, вычислено для $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{BrO}_4$: 365.0359 и 367.0339; найдено: 365.0359 и 367.0338.

5-Аллил-4'-гидрокси-2-((1,1-диметилэтил-оксикарбонил)окси)-3-метокси-1,1'-бифенил (III). $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (0.20 г, 0.17 ммоль, 4%) добавляли к смеси соединения (**II**) (1.40 г, 4.08 ммоль), 4-гидроксифенилбороновой кислоты (0.61 г, 4.40 ммоль), 4-диметиламинопиридин (0.040 г, 0.33 ммоль), 1 М водного карбоната натрия (10 мл, 10.0 ммоль) и 1,4-диоксана (10 мл), полученную смесь перемешивали под аргоном при 95°C в течение 8 ч. После охлаждения до комнатной температуры добавляли воду (40 мл), продукт экстрагировали этилацетатом (3 × 30 мл). Органическую фазу сушили Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении, затем остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гептан/этилацетат = 9 : 1) и получили соединение (**III**) (0.20 г, выход 14%), твердое белое вещество с т. пл. 119–120°C (гексан–дихлорметан = 20 : 1). ^1H -ЯМР (400 МГц; CDCl_3 ; δ , м.д.): 1.41 с (9H, t-BuO), 3.39 д (2H, J 6.8, Ar- CH_2), 3.86 с (3H, CH_3O), 5.04 с (1H, OH), 5.06–5.16 м (2H, $=\text{CH}_2$), 5.97 ддт (1H, J 6.8, 10.0, 17.0, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.75 д (1H, J 2.0, C^4H), 6.77 д (1H, J 2.0, C^6H), 6.82 д (2H, J 8.7, $\text{C}^{3',5'}\text{H}$), 7.31 д (2H, J 8.7, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$). ^{13}C -ЯМР (101 МГц, CDCl_3 ; δ , м.д.): 27.65 ($(\text{CH}_3)_3$), 40.33 ($=\text{CH}-\text{CH}_2$), 56.24 (CH_3O), 83.21 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 111.47 (C^4), 115.23 ($\text{C}^{3',5'}$),

116.36 ($=\text{CH}_2$), 122.30 (C^6), 129.94, 130.40 ($\text{C}^{2',6'}$), 135.42, 135.82, 137.15 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 138.48 (C^5), 151.65 (C^3), 151.75 ($\text{C}=\text{O}$), 155.26 (C^4). HRMS(ESI): m/z , $[M + \text{Na}]^+$, вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5$: 379.1516; найдено: 379.1515. Дальнейшее элюирование системой гептан/этилацетат = 3 : 1 привело к получению продукта без Вос-защиты – 5-аллил-2,4'-дигидрокси-3-метокси-1,1'-бифенила (0.22 г, выход 21%), твердое белое вещество с т. пл. 99–100°C (гексан–дихлорметан = 10 : 1). ^1H -ЯМР (400 МГц; CDCl_3 ; δ , м.д.): 3.36 д (2H, J 6.8, Ar- CH_2), 3.92 с (3H, CH_3O), 4.76 с (1H, OH), 5.05–5.14 м (2H, $=\text{CH}_2$), 5.72 с (1H, OH), 5.98 ддт (1H, J 6.8, 10.0, 17.0, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.68 д (1H, J 1.9, C^4H), 6.76 д (1H, J 1.9, C^6H), 6.88 д (2H, J 8.7, $\text{C}^{3',5'}\text{H}$), 7.50 д (2H, J 8.7, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$). ^{13}C -ЯМР (101 МГц, CDCl_3 ; δ , м.д.): 40.13 ($=\text{CH}-\text{CH}_2$), 56.30 (CH_3O), 109.83 (C^4), 115.28 ($\text{C}^{3',5'}$), 115.82 ($=\text{CH}_2$), 122.44 (C^6), 127.12 (C^1), 130.43 ($\text{C}^{1'}$), 130.58 ($\text{C}^{2',6'}$), 131.52 (C^5), 137.83 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 140.97 (C^2), 146.86 (C^3), 154.85 (C^4). HRMS(ESI): m/z , $[M + \text{Na}]^+$, вычислено для $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_3$: 279.0992; найдено: 279.0986.

5-Аллил-2-((1,1-диметилэтилоксикарбонил)окси)-3-метокси-4'-(2-фторэтокси)-1,1'-бифенил (IV). Смесь соединения (**III**) (0.20 г, 0.56 ммоль), 1-бром-2-фторэтана (0.36 г, 2.81 ммоль, 5-кратный избыток) и K_2CO_3 (0.39 г, 2.8 ммоль) в сухом ацетоне (7 мл) перемешивали 7 ч. Затем отфильтрованный осадок промывали 15 мл ацетона. Раствор концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гептан/дихлорметан = 5 : 1). Полученный продукт (**IV**) (0.18 г, выход 80%) – твердое белое вещество с т. пл. 80–81°C (гексан). ^1H -ЯМР (400 МГц; CDCl_3 ; δ , м.д.): 1.42 с (9H, t-BuO), 3.40 д (2H, J 6.8, Ar- CH_2), 3.86 с (3H, CH_3O), 4.24 дм (2H, $^3J_{\text{HF}}$ 27.8, CH_2O), 4.77 дм (2H, $^2J_{\text{HF}}$ 47.5, CH_2F), 5.07–5.16 м (2H, $=\text{CH}_2$), 5.98 ддт (1H, J 6.7, 10.0, 17.1, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.76 д (1H, J 1.9, C^4H), 6.78 д (1H, J 1.9, C^6H), 6.95 д (2H, J 8.8, $\text{C}^{3',5'}\text{H}$), 7.38 д (2H, J 8.8, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$). ^{13}C -ЯМР (101 МГц, CDCl_3 ; δ , м.д.): 27.65 ($(\text{CH}_3)_3$), 40.34 ($=\text{CH}-\text{CH}_2$), 56.24 (CH_3O), 67.29 д ($^2J_{\text{CF}}$ 20.7, OCH_2), 82.07 д ($^1J_{\text{CF}}$ 170.7, FCH_2), 83.05 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 111.53 (C^4), 114.53 ($\text{C}^{3',5'}$), 116.37 ($=\text{CH}_2$), 122.27 (C^6), 130.29 ($\text{C}^{2',6'}$), 130.59, 135.29, 135.86, 137.14 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 138.44 (C^5), 151.65, 151.69, 158.00 (C^4). ^{19}F -ЯМР (376.5 МГц, CDCl_3 ; δ , м.д.): –223.91. HRMS(ESI): m/z , $[M + \text{Na}]^+$, вычислено для $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{FO}_5$: 425.1735; найдено: 425.1731.

5-Аллил-2-гидрокси-3-метокси-4'-(2-фторэтокси)-1,1'-бифенил (F-XIV). Смесь соединения (**IV**) (0.12 г, 0.30 ммоль) и 2 мл 2 н. HCl в этилацетате кипятили с обратным холодильником 4 ч.

После упаривания при пониженном давлении остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гептан/дихлорметан = 4 : 1) и получили соединение F-XIV (0.048 г, выход 53%), светлое масло. ^1H -ЯМР (400 МГц; CDCl_3 ; δ , м.д.): 3.36 д (2H, J 6.8, Ar- CH_2), 3.92 с (3H, CH_3O), 4.26 дм (2H, $^3J_{\text{HF}}$ 27.8, CH_2O), 4.78 дм (2H, $^2J_{\text{HF}}$ 47.4, CH_2F), 5.05–5.15 м (2H, $=\text{CH}_2$), 5.73 с (1H, OH), 5.99 ддт (1H, J 6.7, 10.0, 17.1, $-\text{CH}=\text{}$), 6.68 д (1H, J 1.9, C^4H), 6.78 д (1H, J 1.9, C^6H), 6.99 д (2H, J 8.8, $\text{C}^{3',5'}\text{H}$), 7.56 д (2H, J 8.8, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$). ^{13}C -ЯМР (101 МГц, CDCl_3 ; δ , м.д.): 40.14 ($=\text{CH}-\text{CH}_2$), 56.30 (CH_3O), 67.29 д ($^2J_{\text{CF}}$ 20.7, OCH_2), 82.10 д ($^1J_{\text{CF}}$ 170.8, FCH_2), 109.85 (C^4), 114.54 ($\text{C}^{3',5'}$), 115.84 ($=\text{CH}_2$), 122.42 (C^6), 126.97, 130.47 ($\text{C}^{2',6'}$), 130.97, 131.50, 137.83 ($-\text{CH}=\text{}$), 141.06, 146.86, 157.70 (C^4). ^{19}F -ЯМР (376.5 МГц, CDCl_3 ; δ , м.д.): –223.87. HRMS(ESI): m/z , $[\text{M} + \text{Na}]^+$, вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{FO}_3$: 325.1210; найдено: 325.1203.

Получение меченных изотопом ^{18}F SAH. Вода (^{18}O] H_2O), с обогащением по изотопу ^{18}O >97%, используемая как сырье для производства радионуклида ^{18}F , была получена от ЗАО “Глобальные научные технологии” (Санкт-Петербург, Россия). Картриджи, содержащие тетраметиламмонийную анионообменную смолу (QMA light Sep-Pak, Waters), активировали 0.5 М K_2CO_3 (10 мл) и водой (15 мл), а картриджи с обращенно-фазовым сорбентом (C18 Plus Sep-Pak, Waters) активировали EtOH (4 мл) и водой (15 мл) непосредственно перед использованием. Липофильные стерильные мембранные фильтры Millex GV (0.22 мкм) были получены от Millipore (США). QMA-элюент был приготовлен, как описано в работе [11]: 99 ± 1 мг (0.25 ммоль) 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана (kryptofix 222) и 20 ± 1 мг (0.12 ммоль) K_2CO_3 растворяли в деионизированной воде Milli Q (0.90 ± 0.05 мл) и ацетонитриле (20 мл). Радиоактивность измеряли на изотопном калибраторе Curiementor 2 (PTW Freiburg, Германия), в биологических исследованиях использовали колодезный гамма-счетчик (БДБСЗ-1ЭМ, Россия). Данные по радиоактивности были скорректированы на распад.

Радионуклид ^{18}F был получен по ядерной реакции $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ облучением мишени, заполненной водой ^{18}O] H_2O , протонами с энергией 16.5 МэВ (ток пучка 30 мкА) в циклотроне PETtrace (GE Healthcare, США). Радионуклид ^{18}F фторид сорбировали из облученной воды на картридже QMA, затем элюировали 2 мл QMA-элюента в реактор автоматизированной системы синтеза (модуля) и выпаривали досуха при 110°C. Синтез

^{18}F фторэтилбромида (^{18}F] F^-EtBr был описан ранее в работе [11]. Кратко, 2-бромэтилтозилат (~7.5 мг, 30 мкМ) в 1 мл *o*-дихлорбензола (*o*-DCB) добавляли в реактор при 110°C, а полученный в результате ^{18}F] F^-EtBr переносили потоком азота (15–20 мл/мин) в сосуд для ^{18}F фторэтилирования, в котором находился раствор субстрата (предшественника), и барботировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Раствор субстрата готовили следующим образом: 1.5–2.0 мг (~4 мкмоль) субстрата растворяли в 0.7 мл DMSO и 150 мкл 0.025 М метоксида калия в DMSO. Мольное соотношение предшественника и основания ~1/2. Реакцию ^{18}F фторэтилирования проводили при 110°C в течение 10 мин. После снятия защитной Вос-группы с 0.3 мл 6 М HCl при 110°C получали радиолиганд ^{18}F] F^-I или ^{18}F] F^-XIV в зависимости от используемого предшественника. Предшественник для ^{18}F] F^-I был описан в работе [11], предшественник для ^{18}F] F^-XIV – соединение (IV), полученное в данной работе. После охлаждения реакционную смесь разбавляли 2 мл воды и наносили на картридж с обращенно-фазовой смолой C18 Plus, который последовательно промывали водой (4 мл) и 50%-ным раствором EtOH (2 мл), а радиолиганд элюировали 70%-ным раствором EtOH (2 мл). Полученный продукт разбавляли в 10 раз стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7.4) для проведения радиометрических тестов биохимических параметров *in vitro* и оценки биораспределения в органах и тканях крыс линии Wistar *ex vivo*. Общее время синтеза составляло 45 мин. Радиолиганды ^{18}F] F^-I и ^{18}F] F^-XIV получены с радиохимическим выходом 30%, радиохимической чистотой $\geq 97\%$ и мольной активностью 35–40 ГБк/мкмоль.

Эффективность протекания реакций, радиохимическую и химическую чистоту продуктов определяли методом обращенно-фазовой радиовЭЖХ (Gilson 305, инжектор Rheodyne-7125, петля 20 мкл) с детекторами по радиоактивности (Beckman 170) и поглощению в УФ-области спектра (Gilson-116, 280 нм), соединенными последовательно. Колонка – Xbridge C18 5 мкм, 150×4.6 мм (Waters, США), элюент – MeCN/ H_2O (55 : 45, v/v), скорость 1.3 мл/мин. Идентификацию радиолиганда проводили путем сравнения его времени удерживания (t_R) со временем удерживания его нерадиоактивного аналога с учетом расстояния между детекторами. Значения t_R для ^{18}F] F^-I , ^{18}F] F^-IV и ^{18}F] F^-XIV составляли 7.0 ± 0.2 , 13.2 ± 0.3 и 11.5 ± 0.3 мин соответственно.

Биохимические параметры SAN. Стабильности в плазме крови. Стабильность [^{18}F]F-I, [^{18}F]F-IV и [^{18}F]F-XIV исследовали в плазме человека при 37°C в диапазоне 0–60 мин в соответствии с методикой [30]. В качестве контроля использовали PBS (pH 7.4). В пробирки с PBS (300 мкл) и плазмой (300 мкл) добавляли 10 мкл раствора, содержащего радиолиганд (~1 МБк). Смесь встряхивали и инкубировали при 37°C. Через промежутки времени 10, 20, 40 и 60 мин брали аликвоту 100 мкл образца, смешивали со 100 мкл охлажденного льдом ацетонитрила и центрифугировали (3 мин, 4500 g). Супернатанты анализировали методом радио-ТСХ на радиометре Scan-RAM (LabLogic Systems Ltd., Великобритания) с элюентом этилацетат/гексан/этанол 2/2/1, v/v/v.

Липофильность. Для измерения распределения радиолигандов между 1-октанолом и фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и расчета величин $\log D_{7.4}$, которые определяют липофильность, использовали метод “встряхивания” [20]. В пробирку, содержащую 10 мкл [^{18}F]F-I, [^{18}F]F-IV или [^{18}F]F-XIV (~1 МБк), добавляли 1.5 мл PBS, насыщенного 1-октанолом, и 1.5 мл 1-октанола, предварительно насыщенного PBS, встряхивали в течение 15 мин. Затем пробирку центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин, чтобы обеспечить полное разделение фаз. Из каждой фазы отбирали аликвоты по 500 мкл в отдельные пробирки и измеряли активность на γ -счетчике. Измерения проводили трехкратно. Значение $\log D_{7.4}$ рассчитывали для пяти независимых экспериментов по формуле (1):

$$\log D_{7.4} = \log \left(\frac{\text{Число импульсов в 1-октаноле}}{\text{Число импульсов в PBS}} \right). \quad (1)$$

Свободная фракция радиолиганда в плазме крови. Для оценки параметра связывания радиолигандов с белками плазмы (РРВ), определяющего неспецифическое взаимодействие радиолигандов, использовали метод ультрафильтрации [21] в плазме крыс линии Wistar. Равные объемы (500 мкл) плазмы или PBS (контроль) смешивали с приготовленным раствором радиолиганда (5 МБк в 50 мкл PBS) и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. После инкубации аликвоты смеси (200 мкл) переносили в пробирки для ультрафильтрации (Amicon 3K; Merck, США) и центрифугировали при 7000 g в течение 15 мин. Равные аликвоты (20 мкл) плазмы (C_{total}) и ультрафильтрата (C_{free}) измеряли с помощью γ -счетчика. Полученные данные корректировали с учетом связывания радиолиганда с мембраной фильтра. Фильтрацию проводили дважды. Несвязанную (свободную) фрак-

цию радиолиганда f_u (%) рассчитывали по формуле (2):

$$f_u = C_{\text{free}}/C_{\text{total}} \times 100. \quad (2)$$

Экспериментальные модели воспаления. В работе использовали 40 мышей C57BL/6 (самцы, 8–10 недель, 20 ± 2 г) и 10 крыс линии Wistar (самцы, 6–8 недель, 250 ± 25 г), полученных из питомника лабораторных животных Рапполово НИЦ “Курчатовский институт”. Перед началом исследования животных рандомизировали по массе тела.

Острое системное воспаление моделировали у мышей линии C57BL/6 путем внутрибрюшинного однократного введения ЛПС из *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, США) в дозе 2 мг/кг через 1 ч после введения лиганда F-I или плацебо (PBS, pH 7.4). F-I вводили в дозе 10 мг/кг в физиологическом растворе, содержащем 5% DMSO, в течение 3 дней (0.4 мл раствора на животное в день). Через 72 ч после введения ЛПС животных подвергали эвтаназии путем помещения их в контейнер автоматической установки подачи CO_2 (Vet Tech Solutions, Великобритания).

Хроническое иммунное воспаление (модель адьювантного артрита, индуцированного ПАФ) моделировали субплантарным введением в правую заднюю лапу мыши 0.05 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) – взвеси БЦЖ 2.5 мг/мл в вазелиновом масле (BD, США). Терапию патологии начинали с 7-го дня после индукции воспаления и продолжали в течение 14 дней. Воспалительную реакцию регистрировали в динамике с помощью инженерного микрометра (Россия). Противовоспалительный эффект оценивали по формуле (3):

$$\text{Угнетение отека (\%)} = 100 - \frac{M(\text{опыт})}{M(\text{контроль})} \times 100, \quad (3)$$

где M – величина отека.

На 21-й день исследования животных подвергали эвтаназии в CO_2 -боксе.

Гистологическое исследование. Для гистологического исследования ткани мозга мышей фиксировали в 10%-ном забуференном растворе формалина и подвергали стандартной проводке в биопсийных кассетах на автоматическом гистопроцессоре Histo-Tek VP1 (Sakura Seiki Co., Япония) с последующим заключением в парафиновый блок в заливочных формах из нержавеющей стали. Из парафиновых блоков были сделаны срезы толщиной 5 мкм и стандартно окрашены крезильным фиолетовым по Нисслию. Гистологические препараты исследовали в световом микроскопе DM1000 (Leica, Германия) при увеличении $\times 400$. Морфо-

метрическую оценку числа поврежденных (пикнотичных) нейронов проводили на гистологических срезах мозга, а именно трех полей гиппокампа (CA1, CA3 и DG) и ассоциативной коры (задней теменной области полушарий). Пикнотические клетки считали с использованием ImageJ Software (NIH, США).

Статистический анализ. Статистический анализ результатов исследования осуществляли с помощью программы Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc.). Проверку на нормальность распределения значений в группах проводили с использованием теста Шапиро–Уилка. Для оценки данных применяли дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим межгрупповым сравнением с использованием теста Тьюки. Также применяли *t*-критерий Стьюдента (для параметрических выборок), *U*-критерий Манна–Уитни (для непараметрических выборок). Различия считали значимыми при уровне $p < 0.05$.

Биораспределение радиолиганда [^{18}F]F-I. Биораспределение радиолиганда [^{18}F]F-I в органах и тканях животных с РА изучали на крысах Wistar. Хроническое воспаление моделировали субплантарным введением в правую заднюю лапу 0.1 мл ПАФ семи особям. Трём интактным животным вместо ПАФ вводили 1 мл/кг PBS, pH 7.4. Радиолиганд [^{18}F]F-I в дозе 0.3 мКи и в объеме 0.2 мл вводили внутривенно в хвостовую вену на 14-й день моделирования артрита. Двум животным с моделью артрита предварительно (за 30 мин до введения [^{18}F]F-I) вводили немеченый лиганд F-I, а одному животному – цецекоксиб в дозе 10 мг/кг. Распределение по органам изучали через 45 мин после введения инъекции [^{18}F]F-I после эвтаназии животных в CO_2 -боксе. Отобранные образцы крови и некоторых органов, а именно трех отделов мозга (кора мозга, мозжечок, и продолговатый мозг), тимуса, сердца, легких, селезенки, почек, печени, мочевого пузыря и мышц, взвешивали. Радиоактивность в каждом образце ткани измеряли с помощью колодезного γ -счетчика для расчета процента введенной дозы на 1 г ткани (% ВД/г). Данные представляли в виде средних значений $\pm$ среднеквадратичное отклонение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показана возможность использования модели РА для изучения противовоспалительной и нейропротективной активности САН на примере F-I, а также для оценки его меченого аналога в качестве потенциального ПЭТ-радиотрейсера нейровоспаления. Показано, что F-I значительно ингибирует периферическое воспаление (отек лапы) и уменьшает число поврежденных нейронов

в коре мозга, очаге локализации нейровоспаления в рассматриваемой модели РА у мышей. К сожалению, результаты биораспределения радиолиганда [^{18}F]F-I в мозге крыс линии Wistar с РА, вызванным введением ПАФ, не столь убедительны.

В целом полученные результаты позволяют заключить, что модель РА, индуцированного ПАФ, пригодна для оценки потенциальных противовоспалительных агентов нейровоспаления на основе структуры САН. Дальнейшие исследования будут направлены не только на поиск и разработку новых эффективных САН, потенциальных ПЭТ-радиолигандов нейровоспаления, но и на адаптацию модели адьювантного артрита для их оценки, а также на изучение механизмов передачи периферического воспаления мозгу с использованием меченых САН.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.Г. Петухову, доктору физико-математических наук, ведущему научному сотруднику Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ “Курчатовский институт”, за помощь в проведении расчетов ADME.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации, тема № FMMW-2025-0010.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальные исследования проводили в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными согласно Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Исследования на животных были одобрены биоэтической комиссией ФГБУ “НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева” (протокол № 9 от 3 июня 2019 г.).

Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи и дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beaino W., Janssen B., Vugts D.J., de Vries H.E., Windhorst A.D. // Clin. Exp. Immunol. 2021. V. 206. P. 282–300.
<https://doi.org/10.1111/cei.13649>
2. Ransohoff R.M. // Science. 2016. V. 353. P. 777–783.
<https://doi.org/10.1126/science.aag2590>
3. Jain P., Chaney A.M., Carlson M.L., Jackson I.M., Rao A., James M.L. // J. Nucl. Med. 2020. V. 61. P. 1107–1112.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.119.229443>
4. Rauf A., Olatunde A., Imran M., Alhumaydhi F.A., Aljohani A.S.M., Khan S.A., Uddin M.S., Mitra S., Emran T.B., Khayrullin M., Rebezov M., Kamal M.A., Shariati M.A. // Phytomedicine. 2021. V. 90. P. 153647.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153647>
5. Tylińska B., Janicka-Kłos A., Gębarowski T., Nowotarska P., Plińska S., Wiatrak B. // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. P. 11011.
<https://doi.org/10.3390/ijms252011011>
6. Wongso H. // J. Pharm. Anal. 2022. V. 12. P. 380–393.
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.07.006>
7. Uzuegbunam B.C., Librizzi D., Hooshyar Yousefi B. // Molecules. 2020. V. 25. P. 977.
<https://doi.org/10.3390/molecules25040977>
8. Tesse G., Tolomeo A., De Filippis B., Giampietro L. // Molecules. 2024. V. 29. P. 4260.
<https://doi.org/10.3390/molecules29174260>
9. Sivak K.V., Stosman K.I., Muzhikyan A.A., Alexandrov A.G., Viktorov N.B., Vaulina D.D., Gomzina N.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 425–429.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019040113>
10. Kiseleva M.M., Vaulina D.D., Sivak K.V., Alexandrov A.G., Kuzmich N.N., Viktorov N.B., Kuznetsova O.F., Gomzina N.A. // ChemistrySelect. 2020. V. 5. P. 2685–2689.
<https://doi.org/10.1002/slct.201904788>
11. Vaulina D.D., Stosman K.I., Sivak K.V., Alexandrov A.G., Viktorov N.B., Kuzmich N.N., Kiseleva M.M., Kuznetsova O.F., Gomzina N.A. // Molecules. 2021. V. 26. P. 6630.
<https://doi.org/10.3390/molecules26216630>
12. Roy T., Ghosh S. // Indo Am. J. Pharm. Res. 2013. V. 3. P. 6131–6142.
13. Zhao T., Xie Z., Xi Y., Liu L., Li Z., Qin D. // Front. Immunol. 2022. V. 13. P. 887460.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.887460>
14. Shrestha S., Kim M.J., Eldridge M., Lehmann M.L., Frankland M., Liow J.S., Yu Z.X., Cortes-Salva M., Telu S., Henter I.D., Gallagher E., Lee J.H., Fredericks J.M., Poffenberger C., Tye G., Ruiz-Perdomo Y., Anaya F.J., Montero Santamaria J.A., Gladding R.L., Zoghbi S.S., Fujita M., Katz J.D., Pike V.W., Innis R.B. // J. Neuroinflammation. 2020. V. 17. P. 140.
<https://doi.org/10.1186/s12974-020-01804-6>
15. Uzuegbunam B.C., Rummel C., Librizzi D., Culmsee C., Hooshyar Yousefi B. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 17419.
<https://doi.org/10.3390/ijms242417419>
16. Gao D., Gao X., Yang F., Wang Q. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 8158.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158158>
17. Wu F., Zhou Y., Li L., Shen X., Chen G., Wang X., Liang X., Tan M., Huang Z. // Front. Chem. 2020. V. 8. P. 726.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00726>
18. Pike V.W. // Curr. Med. Chem. 2016. V. 23. P. 1818–1869.
<https://doi.org/10.2174/0929867323666160418114826>
19. Gobbi L., Mercier J., Bang-Andersen B., Nicolas J.M., Reilly J., Wagner B., Whitehead D., Briard E., Maguire R.P., Borroni E., Auberson Y.P. // ChemMedChem. 2020. V. 15. P. 585–592.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201900608>
20. Wilson A.A., Jin L., Garcia A., DaSilva J.N., Houle S. // Appl. Radiat. Isot. 2001. V. 54. P. 203–208.
[https://doi.org/10.1016/s0969-8043\(00\)00269-4](https://doi.org/10.1016/s0969-8043(00)00269-4)
21. Moein M.M., Nakao R., Amini N., Mohamed Abdel-Rehim M., Schou M., Halldin C. // Trends Anal. Chem. 2019. V. 110. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.019>
22. Kumwittaya S., Nantasenamat C., Treeratanapiboon L., Srisarin A., Isarankura-Na-Ayudhya C., Prachayasittikul V. // Biomed. Appl. Technol. J. 2013. V. 1. P. 16–34
23. Usach I., Alaimo A., Fernández J., Ambrosini A., Mocini S., Ochiuz L., Peris J.-E. // Pharmaceutics. 2021. V. 13. P. 224.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020224>
24. Nasuti C., Fedeli D., Bordoni L., Piangerelli M., Servili M., Selvaggini R., Gabbianelli R. // Antioxidants (Basel). 2019. V. 8. P. 342.
<https://doi.org/10.3390/antiox8090342>
25. Hoogland I.C., Houbolt C., van Westerloo D.J., van Gool W.A., van de Beek D. // J. Neuroinflammation. 2015. V. 12. P. 114.
<https://doi.org/10.1186/s12974-015-0332-6>
26. Banks W.A., Gray A.M., Erickson M.A., Salameh T.S., Damodarasamy M., Sheibani N., Meabon J.S., Wing E.E., Morofuji Y., Cook D.G., Reed M.J. // J. Neuroinflammation. 2015. V. 12. P. 223.
<https://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1>

27. Süß P., Rothe T., Hoffmann A., Schlachetzki J.C.M., Winkl J. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 612104. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.612104>
28. Lewis M.J., Barnes M.R., Blighe K., Goldmann K., Rana Sh., Hackney J.A., Ramamoorthi N., John Ch.R., Watson D.S., Kummerfeld S.K., Hands R., Rihahi S., Rocher-Ros V., Rivellese F., Humby F., Kelly S., Bombardieri M., Ng N., DiCicco M., van der Heijde D., van der Helm-van Mil R.L., Cauli A., McInnes I.B., Buckley Ch.D., Choy E., Taylor P.C., Townsend M.J., Pitzalis M. // *Cell Rep.* 2019. V. 28. P. 2455–2470.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.091>
29. Yan X., Noergaard M., Morse C.L., Liow J.S., Hong J., Greve D., Telu S., Kim M.J., Montero Santamaria J.A., Galassi A., Feng N., Williams Avram S.K., Usdin T.B., Wu S., Zhang A., Manly L.S., Jenkins M., Van Buskirk M., Lee A., Zoghbi S.S., Pike V.W., Zanotti-Fregonara P., Innis R.B. // *J. Nucl. Med.* 2025. V. 66. P. 398–404. <https://doi.org/10.2967/jnumed.124.268525>
30. Slavik R., Müller Herde A., Haider A., Krämer S.D., Weber M., Schibli R., Ametamey S.M., Mu L. // *J. Neurochem.* 2016. V. 138. P. 874–886. <https://doi.org/10.1111/jnc.13716>

Preliminary Evaluation of Structural Analogs of Honokiol in a Rheumatoid Arthritis Model for the Development of Radioligands for Visualization of Neuroinflammation

K. I. Stosman*, K. V. Sivak*, **, D. D. Vaulina***, N. B. Viktorov****, M. M. Lyubishin*, and N. A. Gomsina****, #

Phone: +7 (921) 747–76–94; e-mail: gomzina@ihb.spb.ru

* Smorodintsev Research Institute of Influenza, ul. Professora Popova 15/17, Saint Petersburg, 197376 Russia

** St. Luke's Clinical Hospital, ul. Chugunnaya 44/2, Saint Petersburg, 194044 Russia

*** N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, ul. Acad. Pavlova 9, Saint Petersburg, 197022 Russia

**** St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), Moskovsky prosp. 26, Saint Petersburg, 190013 Russia

Neolignans honokiol and 4'-O-methylhonokiol are known for their neuroprotective and anti-inflammatory activities. Previously, we demonstrated that cyclooxygenase-2 (COX-2) can serve as a target for structural analogs of honokiol (SAH) in a model of neuroinflammation induced by lipopolysaccharide (LPS), and that [^{18}F]-labeled SAH ($T_{1/2} = 109.8$ min) can be potential radioligands for neuroinflammation visualization using positron emission tomography (PET). In this study, we propose, for the first time, a rheumatoid arthritis (RA) model – a chronic inflammation leading to neuroinflammation – for evaluating SAH. The ligand 2-hydroxy-4'-(2-fluoroethoxy)-5-ethoxy-1,1'-biphenyl (F-I) was selected from three SAH with a fluoroethoxy group for testing in the RA model, as it has optimal biochemical parameters responsible for its pharmacokinetic behavior *in vivo*. These parameters (lipophilicity, metabolic stability, etc.) were determined *in vitro* for radiofluorinated SAH obtained via ^{18}F -fluoroethylation of precursors with Boc-protecting groups. RA was induced using Freund's complete adjuvant (FCA). In the RA model in C57BL/6 mice, it was shown that F-I inhibited peripheral inflammation (paw edema) by ~30%, and neuroinflammation (neuronal damage), predominantly localized in the associative cortex of the brain, by ~60%. Preliminary biodistribution results of [^{18}F]F-I in Wistar rats with an FCA-induced RA model showed low accumulation of radioactivity in the brain compared to the intact group. Pre-administration of non-labeled F-I or celecoxib resulted in a decrease in [^{18}F]F-I uptake, which may indicate specific binding to COX-2. Evaluation of the biological activity of SAH in the RA model contributes to the understanding of inflammatory mechanisms and opens the way to the development of new anti-inflammatory agents and PET radiotracers for imaging neuroinflammation.

Keywords: structural analogs of honokiol, neuroinflammation, adjuvant arthritis model, positron emission tomography, radioligand, fluorine-18, cyclooxygenase-2