Levosalmutamol as alternative to drugs on the basis of racemic salbutamol: Review of the results of pre-clinical research

A. G. Miroshnichenko, Y. S. Bulgakova, V. Y. Perfiliev, N. G. Bazarnova

Altai State University, Barnaul, Russia

Article info

Received 10.10.2017

Received in revised form
14.11.2017

Accepted 17.11.2017

Altai State University,
Lenin ave., 61,
Barnaul, 656049,
Russian Federation.
Tel.: +7-385-229-12-09.
E-mail ag.miro@yandex.ru

Miroshnichenko, A. G., Bulgakova, Y. S., Perfiliev, V. Y., & Bazarnova, N. G. (2017). *Levosalmutamol as alternative to drugs on the basis of racemic salbutamol: Review of the results of pre-clinical research. Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(4), 583–595. doi:10.15421/021790

The aim of the work is to conduct an analytical review of the results of preclinical studies of levosalmutamol. The review discusses the pharmacodynamic features of the R-stereoisomer of salbutamol *in vitro*. The chemical bases of interaction of levosalmutamol with β_2 -adrenoreceptors, intracellular signaling cascades associated with β_2 -adrenoreceptors, and structural features of clinically significant ligands of β_2 -adrenoreceptors are presented. Broncholytic activity, influence on the contractility of the diaphragmatic muscles, mucociliary clearance of R-salbutamol in comparison with racemic salbutamol are described. The data presented indicate that all known β_2 -adrenergic receptor-dependent effects of racemic salbutamol, including bronchodilation, are realized by its R-enantiomer. There is evidence that the regular inhalation administration of racemic salbutamol is accompanied by a partial decrease in the bronchoprotective effect and an increase in airway hyperreactivity in response to the action of provocative factors. It was found that the development of hyperreactivity of the respiratory tract is excluded in the case of regular inhalation of levosalmutamol. Possible mechanisms of the paradoxical bronchoconstrictor effect of the salbutamol dystomer are described. This article shows the beneficial effect of levosalmutamol on mucociliary clearance, its anti-inflammatory activity and antiallergic effect. The image data are compared between the enantiomers and the racemate of salbutamol. Special attention is paid to the pharmacokinetics of enantiomers of salbutamol. The data presented from the preclinical studies provide evidence of chiral inversion of stereoisomers of salbutamol.

Keywords: R-salbutamol; β_2 -agonist; chirality; enantioselectivity; pharmacodynamics

Левосальбутамол как альтернатива лекарственным препаратам на основе рацемического сальбутамола: обзор результатов доклинических исследований

А. Г. Мирошниченко, Я. С. Булгакова, В. Ю. Перфильев, Н. Г. Базарнова

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

Проанализированы результаты доклинических исследований лекарственного средства левосальбутамол. Обсуждаются фармакодинамические особенности R-стереоизомера сальбутамола *in vitro*. Представлены химические основы взаимодействия левосальбутамола с β_2 -адренорецепторами, внутриклеточные сигнальные каскады, ассоциированные с β_2 -адренорецепторами, а также структурные особенности клинически значимых лигандов β_2 -адренорецепторов. Описана бронхолитическая активность, влияние на сократительность диафрагмальных мышц, мукоцилиарный клиренс R-сальбутамола по сравнению с рацемическим сальбутамолом. Приведены данные, которые указывают на то, что все известные β_2 -адренорецепторзависимые эффекты рацемического сальбутамола, включая бронходилатацию, реализуются за счет его R-энантиомера. Имеются свидетельства того, что регулярное ингаляционное введение рацемического сальбутамола сопровождается парциальным снижением бронхопротективного эффекта и увеличением гиперреактивности дыхательных путей в ответ на действие провокационных факторов. При этом развитие гиперреактивности дыхательных путей исключено в случае регулярного ингаляционного введения левосальбутамола. Описаны возможные механизмы парадоксального бронхоконстрикторного действия дистомера сальбутамола. Отмечено благоприятное влияние левосальбутамола на мукоцилиарный клиренс, его противовоспалительная активность и антиаллергическое действие. Данные эффекты сравниваются между энантиомерами и рацематом сальбутамола. Отдельное внимание уделено фармакокинетике энантиомеров сальбутамола. Представлены данные доклинических исследований, свидетельствующие о хиральной инверсии стереоизомеров сальбутамола.

Ключевые слова: R-сальбутамол; β_2 -агонист; энантиоселективность; фармакокинетика; фармакодинамика

Введение

Значительное число синтетических лекарственных средств, доступных в настоящее время для клинического применения, раз-

работано на основе фармакологически активных субстанций, молекулы которых включают, как минимум, один хиральный центр (Calcaterra and D'Acquarica, 2017), представленный в большинстве случаев асимметричным атомом углерода. Присутствие таких

атомов обуславливает способность молекул одного и того же вещества к разнонаправленному вращению в плоскополяризованном свете и формированию право- и левовращающих оптических изомеров, называемых S- и R-энантиомерами, соответственно. Таким образом, энантиомеры – оптические изомеры молекул вещества, характеризующиеся наличием идентичной молекулярной формулы, сходными характеристиками межатомных взаимодействий, аналогичными физическими и химическими свойствами, но обладающие отличной пространственной конфигурацией, обусловленной различием их оптической активности. Эквимольные смеси (50/50) S- и R-энантиомеров веществ, лишенные оптической активности, получили название рацемических.

В настоящее время молекулярная стереохимия является одним из фундаментальных направлений в сфере поиска и разработки лекарственных средств. Изучение хиральных свойств фармакологически активных субстанций обеспечивает глубокое понимание механизмов их взаимодействия с биологическими мишенями (Zhang et al., 2005), что, в свою очередь, ассоциируется с увеличением эффективности поиска «лидеров» с сопутствующим снижением риска неудач на промежуточных этапах разработки лекарственных средств. По данным анализа причин досрочного прекращения клинических исследований II/III фазы впервые предлагаемых лекарственных средств и лекарственных средств, предлагаемых по новым показаниям, почти в трети случаев являлось несоответствие исходов фармакотерапии критериям эффективности (Arrowsmith, 2011).

Эффекты фармакологически активных субстанций реализуются путем их взаимодействия с биологическими мишенями, в качестве которых в случае применения низкомолекулярных веществ выступают, главным образом, протеины, принадлежащие к семействам энзимов, экстраклеточных и ядерных рецепторов (транскрипционных факторов), ионных каналов, транспортных протеинов, и, конечно, рецепторы, ассоциированные с G-протеинами. Последние являются главной молекулярной мишенью фармакологических эффектов антигипертензивных и противоаллергических средств (Gashaw et al., 2012). Взаимодействия лекарственных веществ с таргетными протеинами имитируют динамику связывания эндогенных лигандов с активными сайтами этих протеинов, нередко называемых в литературе «карманами» (binding pockets). Такие карманы формируются определенными последовательностями аминокислотных остатков и детерминируются их физико-химическими характеристиками, что определяет структуру, локализацию и функциональность сайтов связывания с лигандом (Stank et al., 2016).

В настоящее время уже не подвергается сомнению, что эффективность взаимодействия с биологической макромолекулой – мишенью детерминируется геометрическим соответствием молекулы лиганда и активного сайта, то есть их комплементарностью (Kubinyi, 2003). Аминокислоты, за исключением глицина, характеризуются хиральными свойствами, в связи с чем активные сайты связывания в составе протеинов являются асимметричными, а значит, помимо комплементарности, важным условием эффективного взаимодействия с лигандом, обладающим хиральными свойствами, является пространственная конфигурация его энантиомеров. Последняя, в свою очередь, определяет существенные различия аффинитета связывания R- и S-энантиомеров хиральных лекарственных субстанций (Burke and Henderson, 2002; Kubinyi, 2003) и лежит в основе феномена энантиоселективности их фармакокинетики или фармакодинамики (Barnette et al., 2017; Kuchay and Mithal, 2017; Noguchi et al., 2017; Vålitalo et al., 2017). Удаление из лекарственного препарата энантиомера, лишенного фармакологической активности или обладающего неоптимальными фармакодинамическими или фармакокинетическими свойствами, может ассоциироваться с повышением клинической эффективности лекарственных средств, в том числе ранее одобренных для клинического применения, минимизировать фармакодинамическую и фармакокинетическую вариабельность ответов на лечение и, возможно, снизить вероятность развития нежелатель-

ных событий, ассоциированных с фармакотерапией рацематами.

В настоящее время в фармацевтической индустрии распространен термин «gasemic switch», обозначающий процесс вытеснения ранее одобренных лекарственных средств на основе рацематов их энантиомерно чистыми «аналогами» (Milgrom, 2006). Фактически процесс такого вытеснения может квалифицироваться как один из способов расширения перечня инновационных лекарственных препаратов (Blin, 2004), во многом ставший возможным для реализации за счет все большей доступности высокочувствительных методов энантиосепарации и молекулярного моделирования, базирующихся на хиральных различиях энантиомеров и энергии их связывания с полимерными селекторами, чаще всего представленными дериватами β -декстрина или энантиомер-селективными протеинами (Liu et al., 2016; Gutierrez-Climente, et al., 2017; Li et al., 2017; Sardella et al., 2017). Между тем, при рассмотрении вопроса о целесообразности такого вытеснения критически важно оценить не только выполнимость процесса получения интересующей энантиомерно чистой фармакологически активной субстанции и наличие маркетинговых преимуществ лекарственного средства на ее основе, но и наличие клинических преимуществ в сравнении с рацемическим «прототипом» (Milgrom, 2006), тем более, что к настоящему времени в научных публикациях приводятся примеры, указывающие на отсутствие таковых (Gaskell et al., 2017). Таким образом, не вызывает сомнения тот факт, что критически важным этапом в разработке таких лекарственных средств должна являться взвешенная объективная оценка их фармакокинетики, эффективности и безопасности в рамках хорошо спланированных доклинических и клинических исследований с применением современных валидированных научных методов по сравнению с референтными (рацемическими) лекарственными препаратами.

Бронходилататоры – терапевтические агенты, широко применяемые с целью терапии пациентов с бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Расширение бронхов достигается, в первую очередь, посредством локального повышения активности симпатической нервной системы в бронхах, то есть активацией β_2 -адренорецепторов, либо подавлением парасимпатических влияний на фоне блокады М-холинэргических рецепторов. На протяжении последних двадцати лет общая концепция механизмов реализации бронхолитического действия не менялась (Günay et al., 2016). Между тем, в качестве адьювантной фармакологической активности рассматривается потенциальное противовоспалительное действие, обусловленное стабилизацией тучных клеток и подавлением их дегрануляции с выбросом провоспалительных и бронхоконстрикторных медиаторов. Другие потенциальные эффекты включают улучшение мукоцилиарного клиренса и подавление экстравазации протеинов плазмы крови, лежащей в основе экссудации и отека (Broadley, 2006).

Агонисты β_2 -адренорецепторы, такие как сальбутамол, тербуталин, а также их аналоги длительного действия сальмотерол и формотерол являются хиральными агентами и традиционно производятся в форме рацемических смесей, включающих фармакологически активный эутомер и неактивный дистомер. Несмотря на очевидный терапевтический потенциал и широкое клиническое применение, применение β_2 -агонистов довольно противоречиво и ассоциируется с увеличением риска смертности в популяции пациентов с бронхообструктивными заболеваниями, ухудшением контроля заболевания, причины которого остаются в высшей степени трудными для понимания. В качестве клинического аспекта фармакологии β_2 -адренорецепторов признано значение генетического полиморфизма рецепторов и его возможная связь с развитием толерантности к бронходилатации. Противоречивость применения β_2 -адреномиметиков усиливается их стереоизомеризмом и присутствием в составе всех доступных в настоящее время препаратов агонистов β_2 -адренорецепторов фармакологически неактивного S-энантиомеров, обладающих потенциально неблагоприят-

ными эффектами (Broadley, 2006). Токсичность, присущая дистомерам β_2 -адренорецепторов, активно обсуждается, что является триггером вытеснения рацемических препаратов агонистов β_2 -адренорецепторов препаратами энантиомерно чистых субстанций. Этот процесс достиг своей кульминации в разработке и активном внедрении в клиническую практику, начиная с конца 1990-х годов препаратов на основе левовращающего изомера салбутамола – левосальбутамола (Boulton and Fawcett, 2002; Jantikar et al., 2007), презентуемого в качестве альтернативного эффективного и безопасного терапевтического средства для лечения пациентов с бронхиальной астмой и ХОБЛ (Nowak, 2003). Berger (2003) опубликовал обзор по данным оригинальных публикаций в рецензируемых журналах, результатов профессиональных обсуждений, а также информации, представленной производителем препарата Хорепекс® (Serracog Inc., США), с целью обоснования применения левосальбутамола в лечении взрослых пациентов и детей с бронхиальной астмой. Автором показано, что по сравнению с рацематом левосальбутамол обладает преимуществами по эффективности и безопасности у пациентов, страдающих бронхиальной астмой, а также характеризуется позитивным балансом «затраты – эффективность». Однако, по мнению Berger (2003), требуются дополнительные научные доказательства преимуществ левосальбутамола при бронхообструктивных заболеваниях. Таким образом, целью настоящего обзора является представление результатов доклинических исследований специфической фармакологической активности и фармакокинетики левосальбутамола *in vitro* по сравнению с салбутамолом, являющихся важнейшим этапом разработки лекарственных средств в контексте их прогностического значения для оценки эффективности у человека.

Фармакодинамика

Взаимодействие с β_2 -адренорецепторами. У животных и человека бронхоконстрикция устраняется R-эпинефрином, продуцируемым мозговым веществом надпочечников (Handley, 1999; Page and Morley, 1999; Ameredes and Calhoun, 2006). Молекулярной мишенью бронходилатирующего действия R-эпинефрина являются β_2 -адренорецепторы, составляющие около 70% всей популяции β -адренорецепторов в легких. β_2 -Адренорецепторы экспрессируются в гладкомышечных клетках дыхательных путей (главным образом, мелких), эпителиоцитах, гладкомышечных стенках сосудов и субмукозных железах. β_2 -Адренорецепторы детектируются во многих провоспалительных и иммунных клетках, в том числе макрофагах, нейтрофилах, лимфоцитах, эозинофилах, тучных и альвеолярных клетках I и II типов. β_2 -Адренорецепторы относятся к крупному семейству серпентинных, или 7ТМ-трансмембранных рецепторов, α -спираль которых ассоциирована с G-протеинами. 413-аминокислотная последовательность α -спирали β_2 -адренорецепторов имеет большое значение для эффективного связывания с их физиологическим лигандом R-эпинефрином. В частности установлено, что эссенциальные аминокислотные остатки, необходимые для высокоаффинного связывания рецептора с лигандом, локализованы внутри третьей (Asp113), пятой (Ser204 и Ser207) и шестой (Phe259 и Phe290) петель α -спирали, а их пространственная ориентация в структуре трансмембранно локализованной α -спирали скоординирована с комплементарными сайтами молекулы эпинефрина. По этой причине обязательным требованием для высокоаффинного связывания с R-эпинефрином является 3D-конформация протеина β_2 -адренорецептора, организованная по типу «кармана», в котором остаток Asp ответственен за связывание с атомом азота в структуре лиганда, в то время как два остатка Ser связывают гидроксильные группы его фенольного кольца.

По этой причине все клинически значимые агонисты β_2 -адренорецепторов содержат в своей молекуле бензольный цикл с боковой двухуглеродной цепью и концевой (замещенной) ами-

ногруппой, а также нередко в положениях 3 и 4 бензольного цикла свободные гидроксильные группы, что делает их максимально похожими на катехоламины, как в случае с изопротеренолом, являющимся наиболее мощным агонистом β_1/β_2 -адренорецепторов. В случае перепозиционирования гидроксильной группы в бензольном цикле, как, например, в молекуле салбутамола, или замещения аминогруппы агонист приобретает меньший потенциал по сравнению с изопротеренолом, но вместе с тем приобретает резистентность к деградации под действием КОМТ и меньший аффинитет к β_1 -адренорецепторам (Cazzola et al., 2012). Как видно из рисунка 1, структура молекулы салбутамола соответствует всем требованиям эффективного связывания с активными сайтами β_2 -адренорецепторов.

Рис. 1. Структура лигандов β_2 -адренорецепторов – адреналина, изопреналина и салбутамола

В эксперименте *in vitro* аффинитет в отношении β -адренорецепторов, экспрессируемых в предсердиях и трахеях у морских свинок, выраженный в логарифмических единицах, составляет 1,86 и 2,19 соответственно. В ходе анализа тканевой селективности установлено, что R-салбутамолом почти в 24 раза интенсивнее связывается с трахеей, чем с предсердиями. По сравнению с R-изопротеренолом салбутамолом проявил несколько больший потенциал связывания с рецепторами в трахее. Soriano-Ursúa et al. (2010) с применением метода молекулярного докинга подтвердили наличие большего аффинитета R-энантиомеров (эутомеров) бронхолитиков и их способности активировать β_2 -адренорецепторы по сравнению с S-энантиомерами (дистомерами). В исследовании *in vitro* с применением культуры клеток, экспрессирующих β_2 -адренорецепторы человека, R-салбутамолом продемонстрировал в 90–100 раз больший аффинитет в отношении β_1 - и β_2 -адренорецепторов по сравнению с дистомером, что ассоциировалось с 23-кратным увеличением внутриклеточного уровня цАМФ, в то время как рацемический салбутамолом увеличивал концентрацию цАМФ в 24 раза (Penn et al., 1996; Page and Morley, 1999).

Внутриклеточные сигнальные каскады, ассоциированные с β_2 -адренорецепторами. Связывание лиганда с активными сайтами β_2 -адренорецепторов индуцирует конформационные изменения G-белка, сцепленного с внутриклеточным доменом α -спирали. После таких конформационных изменений G-протеин приобретает функции триггера, запускающего обмен гуаниновых нуклеотидов (guanine nucleotide exchange factor, или GEF): от α -субъединицы G-белка отщепляется ГДФ, а вместо него присоединяется ГТФ, что приводит к полной диссоциации комплекса «рецептор – G-белок», при этом фрагменты этого комплекса, а именно G_{α} -ГТФ и $G_{\beta\gamma}$, активируют эффекторные протеины, главным из которых является фермент аденилатциклаза. Активация аденилатциклазы приводит к гидролизу АТФ и накоплению в цитоплазме клетки циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), который, в свою очередь, индуцирует протеинкиназу А, фосфорилирующую ряд таргетных

протеинов клетки, приводящих к снижению внутриклеточного уровня ионов кальция, подавлению гидролиза фосфоинозиотида и снижению продукции инозитолтрифосфата (ИТВ), ингибированию киназы легких цепей миозина, открытию кальций-зависимых калиевых каналов, приводящих к реполяризации клетки и секвестрации ионов кальция во внутриклеточные хранилища и, в конечном итоге, релаксации гладкомышечных клеток (Cazzola et al., 2012; Theron et al., 2013).

Бронхолитическая активность. По данным Lemoine et al. (1992), салбутамол и R-изопреналин индуцируют максимальную релаксацию гладких мышц трахеи морских свинок на фоне парциальной и максимальной контрактильности, индуцированной различными дозами карбахола, причем активность рацемического салбутамола, как предположили исследователи, обусловлена R-энантиомером. Delmotte and Sanderson (2008) изучили эффекты салбутамола и его энантиомеров на сократительную способность гладкомышечных клеток дыхательных путей и Ca^{2+} -зависимую сигнализацию в срезах легких мышей с применением фазоконтрастной и конфокальной микроскопии. R-салбутамол индуцировал дозозависимую релаксацию гладкомышечных клеток на фоне метахолин-индуцированного сокращения, в то время как S-салбутамол не оказывал значимых эффектов. Релаксирующий эффект эутомера был сходен с таковым у рацемического салбутамола, вводившегося в экспериментальную систему в два раза большей концентрации.

Метахолин-индуцированная контрактильность клеток коррелировала с увеличением внутриклеточных токов ионов кальция, интенсивность которых снижалась в присутствии R-энантиомера и рацемата в сходных концентрациях. В то же время эутомер проявил более выраженную активность в снижении чувствительности к Ca^{2+} гладкомышечных клеток. S-энантиомер не влиял на калиевые токи и чувствительность к кальцию в обеих моделях. Исследователи заключили, что R-энантиомер салбутамола индуцирует более выраженную релаксацию гладкомышечных клеток дыхательных путей по сравнению с рацематом, в то время как S-энантиомер может быть ответственен за редуцирование его эффектов. Приведенные данные указывают на то, что все известные β_2 -адренорецептор-зависимые эффекты рацемического салбутамола, включая бронходилатацию, реализуются за счет его R-энантиомера. Westerhof et al. (2005) изучили бронхопротективные эффекты салбутамола и его энантиомеров у морских свинок на фоне их ингаляционного введения в терапевтически релевантных дозах. Базальная реактивность дыхательных путей экспериментальных животных в ответ на введение гистамина редуцировалась по прошествии 30 минут после ингаляции рацемата и его R-энантиомера. Бронхопротективное действие нивелировалось через 3 ч после иницирования эксперимента. На фоне ингаляционного введения за 30 минут до и 5,5 ч после нагрузки аллергеном рацемат и его эутомер подавляли аллерген-индуцированную гиперреактивность дыхательных путей на введение гистамина, полностью устраняя раннюю астматическую реакцию и проявляя тенденцию к супрессии поздней астматической реакции. При этом интенсивность подавления поздней реакции (на пятый час эксперимента) более выражена у животных, получавших R-салбутамол. Введение S-салбутамола не ассоциировалось со значимыми изменениями базальной реактивности или аллерген-индуцированной бронхоконстрикции. Ни рацемат, ни отдельные энантиомеры не влияли на интенсивность инфильтрации дыхательных путей воспалительными клетками. Таким образом, ингаляционное введение рацемического салбутамола и его R-энантиомера в эквивалентных дозах эффективно подавляет ранние и поздние астматические реакции у морских свинок, индуцированные введением аллергена, при этом эутомер проявляет немногим более выраженное бронхопротективное действие. S-салбутамол не оказывает неблагоприятных эффектов.

В рамках рандомизированного, перекрестного исследования Argoyo et al. (2016) проводилась сравнительная оценка эф-

фектов салбутамола и левосалбутамола у лошадей с рекуррентной обструкцией дыхательных путей на фоне их ингаляционного введения с помощью небулайзера. Продолжительность действия салбутамола составила 60, а левосалбутамола 120 минут. При этом значения эффективной дозы (ED_{max}) обоих бронхолитиков отличались незначимо и составляли в среднем 125 и 188 мкг соответственно ($P = 0,068$). Бронхолитическая активность салбутамола и левосалбутамола также значимо не различалась в группах животных: максимальное изменение транспульмонарного давления (DP_{max}) составило 61,1% и 59,9% соответственно ($P = 0,860$). Таким образом, у лошадей с бронхолегочной обструкцией эффективность левосалбутамола эквивалентна таковой у салбутамола, в то время как продолжительность действия энантиомерно чистой субстанции как минимум в два раза выше по сравнению с рацематом.

Влияние на контрактильность диафрагмальных мышц. Хроническая обструкция дыхательных путей, в частности, при ХОБЛ, ассоциируется с дисфункцией респираторных мышц, обусловленной хронической гипоксией и гиперкапническим ацидозом (Esau, 1989; Xu et al., 2006; Angulo et al., 2009). Селективные агонисты β_2 -адренорецепторов могут оказывать прямое инотропное действие, выражающееся в улучшении контрактильности диафрагмальных мышц, тем самым препятствуя прогрессированию респираторной недостаточности (Ito et al., 2006; Uzuki et al., 2006; Uzuki et al., 2007). Angulo et al. (2009) в эксперименте на крысах линии Sprague-Dawley установили, что обструкция дыхательных путей, индуцированная перевязкой трахеи, сопровождается значимым снижением артериального pH и увеличением парциального давления углекислого газа (PaCO_2) и уровня бикарбоната по сравнению со здоровыми животными ($P < 0,05$) на фоне значимого редуцирования пикового напряжения и контрактильности диафрагмальных мышц. Указанные неблагоприятные эффекты нивелировались у крыс, получавших острое и длительное лечение салбутамолом. В рамках исследования Piriz et al. (2008), проводившегося на крысах с индуцированным перитонеальным сепсисом, введение салбутамола ассоциировалось со значимым увеличением аортального кровотока и повышением ЧСС на фоне сопутствующего снижения АД, повышения силы диафрагмального сокращения.

Ранее в эксперименте *in vitro* Van Der Heijden et al. (1997) подтвердили способность салбутамола оказывать позитивное инотропное действие на диафрагмальные мышцы. Данный эффект устранялся блокатором рианодинных рецепторов саркоплазматического ретикулума, что указывает на то, что контрактильные эффекты бронхолитика реализуются за счет увеличения выброса внутриклеточного кальция (Van Der Heijden et al., 1997). По данным других групп исследователей, у собак, в отличие от ряда иных агонистов β_2 -адренорецепторов, салбутамол ни в одной из тестируемых доз не оказывает значимого влияния на трансдиафрагмальное давление, генерируемое супрамаксимальной электрической стимуляцией диафрагмального нерва на фоне внутривенного болюсного или инфузионного введения лекарственного средства, что указывает на отсутствие значимой инотропной активности бронхолитика у данного вида лабораторных животных (Derom et al., 1997). Видимо, у человека салбутамол также лишен клинически значимого инотропного потенциала (Javaheri et al., 1988).

Гиперреактивность дыхательных путей – обратная сторона бронхолитического действия агонистов β_2 -адренорецепторов

Имеются свидетельства того, что регулярное ингаляционное введение рацемического салбутамола в кумулятивных дозах ассоциируется с парадоксальными реакциями у некоторых пациентов с бронхообструктивными заболеваниями (Page and Morley, 1999), выражающимися в парциальном снижении бронхопротективного эффекта и увеличении гиперреактивности дыхательных путей в ответ на действие провокативных

факторов (Cockcroft et al., 1999; Nelson, 1999). Подобный феномен вряд ли ассоциирован с активацией β_2 -адренергических рецепторов, в силу чего возникло предположение о возможной роли S-энантиомера в развитии данной реакции (Page and Morley, 1999). Handley et al. (1998) указывают на то, что развитие гиперреактивности дыхательных путей исключено в случае регулярного ингаляционного введения левосальбутамола.

В этой связи обращает на себя внимание исследование Matera et al. (2011), где в эксперименте *in vitro* с применением бронхов, изолированных у здоровых лошадей и животных с рекуррентной обструкцией дыхательных путей, установлено, что ни один из энантиомеров салбутамола не оказывает релаксирующего действия на фоне субмаксимального плато контрактильности, индуцированной карбахолом, но при этом по сравнению с контролем и R- и S-салбутамолом оказывали слабое, но значимое контрактильное действие ($P < 0,05$). В то же время эутомер индуцировал значимую релаксацию мышц на фоне гистамин-индуцированного сокращения (бронхи здоровых лошадей – $92,1 \pm 2,0\%$, бронхи лошадей с обструкцией – $100,2 \pm 4,0\%$, $P < 0,01$), а дистомер оказывал лишь слабое релаксирующее действие (бронхи здоровых лошадей – $15,8 \pm 5,7\%$, бронхи лошадей с обструкцией – $12,4 \pm 5,2\%$) по сравнению с папаверином. Инкубирование с R- или S-салбутамолом ассоциировалось со смещением кривой контрактильности мышц животных в ответ на карбахол вправо относительно контроля ($P < 0,001$) и с отсутствием значимых изменений в эксперименте с применением бронхов лошадей с обструкцией.

В нормальных бронхах R-салбутамолом приводил к значимому снижению $E_{\max}$ ($6,36 \pm 0,21$ против $9,07 \pm 0,68$ г в контроле, $P < 0,01$) и редуцировал активность потенциала в отношении мышц животных с обструкцией (EC_{50} $7,10 \pm 0,35$ мкмоль, $P < 0,001$). В случае применения S-салбутамола кривая концентрации гистамина смещалась влево для бронхов здоровых животных ($2,25 \pm 0,19$ мкмоль против контроля $7,00 \pm 0,29$ мкмоль, $P < 0,001$) и лошадей с обструкцией ($1,50 \pm 0,80$ мкмоль против контроля $2,80 \pm 0,26$ мкмоль, $P < 0,05$). Таким образом, S-салбутамолом у лошадей умеренно потенцирует контрактильность гладкомышечных стенок дыхательных путей, индуцированную карбахолом, а также вызывает гиперреактивность на фоне введения гистамина. Эти данные подтверждают способность S-энантиомера салбутамола потенцировать контрактильные ответы спазмогенов.

Примером того, что S-энантиомеру салбутамола присущ ряд фармакологических свойств, не связанных с его β_2 -адренергическим потенциалом, может служить работа Keir et al. (2002). Они в эксперименте на овальбумин-сенситизированных морских свинках, получавших в течение 10-дневного периода посредством длительной подкожной инфузии (RS)-, R- или S-салбутамола (1 мг/кг·день) установили, что регулярное введение рацемата или S-энантиомера ассоциируется со значимым увеличением реактивности дыхательных путей на различные провокационные стимулы, при этом сопутствующее введение капсаицина предупреждает этот эффект. Интересно, что бронходилатирующая активность рацемата после его острого внутривенного введения животным, получавшим RS-, R- или S-салбутамолом, не снижалась по сравнению с животными, получавшими плацебо. В итоге, Keir et al. (2002) пришли к выводу, что толерантность к бронхолитическим эффектам RS-, R- или S-салбутамола, развивающаяся при длительном введении, скорее всего, не связана с оккупацией β_2 -адренорецепторов или их десенситизацией, а, как минимум частично, со снижением восприимчивости капсаицин-чувствительных нервов.

По данным другого эксперимента с аналогичным дизайном также сделаны подобные выводы. У морских свинок подкожное введение рацемического салбутамола в дозе $0,2 \text{ мг/кг·день}$ в течение 10 суток также ассоциировалось с частичным увеличением бронхореактивности на введение гистамина, метахолина и бомбезина. Последующее острое внутривенное введение салбутамола подавляло бомбезин-индуцированную бронхо-

констрикцию. С учетом того, что салбутамолом сохраняет свои бронходилатирующие эффекты, десенситизация β_2 -адренорецепторов, возможно, не является основной причиной развития толерантности к бронхолитику при его регулярном применении (Buchheit et al., 1995). S-салбутамолом метаболизируется значительно медленнее по сравнению с эутомером и сохраняется преимущественно в верхних дыхательных путях, что может стать триггером парадоксальных эффектов при регулярном применении рацемата в высоких дозах (Page and Morley, 1999). Это указывает на то, что дистомеры агонистов β_2 -адреномиметиков могут являться причиной повышения заболеваемости и смертности у пациентов с бронхиальной астмой (Handley et al., 1998; Ameredes and Calhoun, 2010). В эксперименте Mazzoni et al. (1994) острое подкожное инфузионное введение рацемического салбутамола ($0,69 \text{ мкг/кг·мин}$ в течение менее 1 ч) ассоциировалось с полным подавлением аллергического бронхоспазма у сенситизированных морских свинок. Более длительное введение приводило к прогрессивному повышению чувствительности животных к антигену в условиях его ингаляционного введения, при этом через 48 ч после ингаляции в группах экспериментальных животных регистрировались случаи развития коллапса и смерти. Между тем, острая инфузия рацемата в дозе $1,67 \text{ мкг/кг·мин}$ подавляла обструкцию дыхательных путей, что, вероятно, обусловлено активацией β_2 -адренорецепторов R-салбутамолом, в то время как внутривенное введение S-энантиомера в аналогичной дозе индуцировало гиперреактивность к гистамину без сопутствующего изменения калибра дыхательных путей. Результаты этих наблюдений указывают на то, что при подкожном инфузионном введении рацемического салбутамола первоначально предотвращает бронхоконстрикторные ответы на антиген в силу доминирования бронходилатирующей активности эутомера над способностью дистомера индуцировать гиперреактивность. Конверсия протективного действия на повышение чувствительности к антигену не связана с редуцированием пула β_2 -адренорецепторов или интенсивности их стимуляции, поскольку в эксперименте подкожное введение рацемата или ингаляция рацемического изопrenalина оказывали протективные эффекты против летальных доз антигена. Прогрессивное снижение эффективности R-салбутамола может являться следствием диспропорциональной кумуляции дистомера у животных подобно человеку в силу стереоселективности метаболизма R-салбутамола.

Для того, чтобы внести ясность в возможные механизмы парадоксального бронхоконстрикторного действия дистомера салбутамола, обратим внимание на работу Mitra et al. (1998), которые изучили эффекты S-салбутамола на внутриклеточный уровень кальция Ca^{2+} в культуре диссоциированных гладкомышечных клеток бычьей трахеи. Так, S-салбутамолом в концентрациях выше 1 пмоль и рацемат в концентрации 1 нмоль индуцировали увеличение Ca^{2+} на 150 и 100 нмоль соответственно, что строго контрастировало с R-энантиомером, индуцировавшим снижение концентрации ионов. Увеличение Ca^{2+} блокировалось в присутствии атропина и 4-дифенилacetоксин-N-метилпиперидина, но интенсифицировалось на фоне ICI-118551 – блокатора β_2 -адренорецепторов. При 30-секундной экспозиции дистомером в клетках регистрировали увеличение уровня инозитолтрифосфата в среднем на $213,0 \pm 34,4\%$. Отсутствие значимых изменений Ca^{2+} в среде, свободной от ионов кальция, указывает на то, что эффекты S-салбутамола обусловлены увеличением внутриклеточных токов ионов. Исследователи заключили, что S-салбутамолом может перекрестно реагировать с мускариновыми рецепторами. При этом, Bosak et al. (2017) в эксперименте с применением трех вариантов бутирилхолинэстеразы (BChE), выделенной из плазмы донорской крови, а также рекомбинантной AChE человека, установили, что β_2 -адреномиметики, в том числе салбутамолом, обладают свойствами обратимых ингибиторов холинэстеразы. При этом ингибиторная активность салбутамола в отношении AChE (K_i $2,0 \pm 0,2 \text{ ммоль}$) почти в два раза превышает таковую у тербу-

талины ($4,8 \pm 0,2$ ммоль). В отношении типичной BChE активность салбутамола увеличивается в 28 раз ($0,071 \pm 0,006$ ммоль). Связывание с активными центрами холинэстераз не является стереоселективным. Так, значения K_i R-салбутамола для AChE и BChE составили $4,0 \pm 0,3$ и $0,19 \pm 0,04$ ммоль, S-салбутамола – $1,8 \pm 0,1$ и $0,31 \pm 0,05$ ммоль, соответственно. С учетом приведенных данных можно предположить, что в условиях экспозиции оба энантиомера могут индуцировать локальное повышение активности холинергической системы, в том числе за счет подавления активности AChE в синаптической щели холинергических синапсов, увеличивая тем самым уровень медиатора ацетилхолина и косвенно интенсифицируя его бронхоконстрикторное действие.

Agrawal et al. (2004) сравнили клеточные эффекты салбутамола и его энантиомеров на внутриклеточную сигнализацию, вовлекаемую в констрикторные и воспалительные ответы гладкомышечных клеток бронхов человека. В первичной культуре миоцитов S-энантиомер значимо и дозозависимо индуцировал увеличение экспрессии и активности $G_{i\alpha}$ -протеина и снижение экспрессии G_s -протеина адrenoцепторов. Рецептор-независимая активация аденилатциклазы форсколином устранялась в присутствии S-салбутамола. По прошествии 24 ч инкубирования с дистомером в клетках отмечали увеличение Ca^{2+} в ответ на стимуляцию метахолином. Эффекты S-салбутамола полностью противоположны таковым у R-энантиомера, а активность рацемического салбутамола по некоторым параметрам сходна с таковой у дистомера. S-салбутамол индуцировал активацию PI3-киназы и NF- κ B в гладкомышечных клетках. Таким образом, экспериментально установлено, что S-салбутамол может вызывать up-регуляцию экспрессии и активности проконстрикторных путей с участием $G_{i\alpha}$ -протеина, Ca^{2+} , а также снижать активность бронходилатирующих механизмов с участием G_s -протеина. Дистомер также индуцирует провоспалительные каскады с участием PI3-киназы и NF- κ B. С учетом того, что S-салбутамол метаболизируется в 10 раз медленнее по сравнению с эутомером, и его $T_{1/2}$ более продолжителен, очевидно, что гладкомышечные клетки могут подвергаться длительной экспозиции S-салбутамолом, что увеличивает риск его неблагоприятных провоспалительных и констрикторных эффектов в случае систематического приема рацемического салбутамола при хронических заболеваниях, в том числе при бронхиальной астме. По данным других исследователей, устранение из рацемата S-салбутамола, обладающего провоспалительными свойствами, может элиминировать персистирующую обструкцию бронхов и снижать их эластичность, ассоциированную с увеличением интенсивности воспаления, уменьшением отека и подавлением активации лейкоцитов при ХОБЛ (Costello, 1999).

Некоторые исследователи все же не исключают, что развитие гиперреактивности дыхательных путей и снижение бронхопротекторного действия салбутамола на молекулярном уровне может объясняться функциональной десенситизацией (down-регуляция) β_2 -адrenoцепторов, экспрессируемых в гладкомышечных клетках дыхательных путей с сопутствующим повышением активности ассоциированной с ними аденилатциклазы (Herepath and Broadley, 1992; Hauck et al., 1997; Boskabady and Aslani, 2007). Cooper and Panettieri (2008) в эксперименте с применением тонких срезов легкого человека, содержащих фрагменты дыхательных путей, установили, что салбутамол стимулирует время- и дозозависимое снижение изопроterenол-индуцированной релаксации, достигающей 45,0% ($P = 0,011$). Это указывает на способность бронхолитика в условиях длительной экспозиции десенситизировать β_2 -адrenoцепторы за счет активации протеинкиназы A. Указанный эффект салбутамола нивелировался в присутствии дексаметазона. Позднее подтверждена роль глюкокортикостероидов в превентировании и реверсировании толерантности β_2 -адrenoцепторов на фоне десенситизирующих эффектов длительнодействующих β_2 -адrenomиметиков (Cooper et al., 2011). Это указывает

на то, что десенситизация рецепторов дыхательных путей является класс-специфическим эффектом агонистов β_2 -адrenoцепторов. После связывания с агонистом β_2 -адrenoцепторы подвергаются быстрой интернализации с последующим перераспределением (эндоцитозом) рецепторов из плазматической мембраны в цитозольные везикулы.

Дополнительные благоприятные эффекты β_2 -агонистов

Влияние на мукоцилиарный клиренс. Важным эффектом агонистов β_2 -адrenoцепторов является увеличение частоты биения ресничек мерцательного эпителия, интегрального показателя мукоцилиарного клиренса. По данным Sabater et al. (2005), у овец салбутамол (180 мкг) и сальмотерол (42 мкг) значимо интенсифицируют обмен трахеальной слизи (tracheal mucus velocity (TMV) в течение 6-часов после ингаляционного введения, а также нивелируют неблагоприятные эффекты ингаляционного введения эластазы нейтрофилов человека, выражающиеся в снижении мукоцилиарного клиренса. В эксперименте с применением овечьих эпителиоцитов дыхательных путей и метода цифровой видеомикроскопии Frohock et al. (2002) подтвердили способность R-энантиомера рацемического салбутамола дозозависимо стимулировать повышение активности ресничек мерцательного эпителия на $24,4 \pm 5,4\%$ в сравнении с базальным уровнем ($7,2 \pm 0,2\%$), в то время как рацемат – всего на $12,8 \pm 3,6\%$, что значимо меньше в сравнении с энантиомером, несмотря на его присутствие в рацемате в эквипотентной концентрации.

По данным регистрации внутриклеточных токов кальция в отдельных клетках установлено, что стимулирующий эффект R-салбутамола ассоциирован со стимуляцией β_2 -адrenoцепторов и активацией протеинкиназы A по Ca^{2+} -зависимому и Ca^{2+} -независимому механизмам. Дистомер индуцировал лишь ничтожно малые изменения активности ресничек эпителиоцитов и не изменял концентрацию внутриклеточного кальция. Таким образом, позитивные эффекты рацемического салбутамола на цилиарный клиренс обусловлены присутствием в его составе R-энантиомера.

McAuley et al. (2004) в рамках проспективного, рандомизированного исследования на лабораторных крысах с нормальной легочной функцией и с экспериментально индуцированным повреждением легких установили, что рацемический салбутамол (10^{-5} моль) и изопроterenол (10^{-6} моль) стимулируют повышение клиренса альвеолярной жидкости до уровня, сравнимого с максимальным при введении дибутирил-цАМФ ($32,9 \pm 10,9\%/ч$ против базального $7,6 \pm 2,2\%/ч$, $P < 0,05$). По сравнению с базальным уровнем и рацемический салбутамол (10^{-6} моль) и его эутомер (10^{-6}) вызывают сходное увеличение клиренса альвеолярной жидкости ($14,5 \pm 3,0\%$ ($P < 0,05$) и $15,0 \pm 4,6\%$ ($P < 0,05$) без значимых различий между группами. Таким образом, в клинически релевантных концентрациях салбутамол и его эутомер стимулируют в здоровых легких цАМФ-зависимое повышение альвеолярного клиренса и редуцируют легочный отек в условиях легочного повреждения за счет увеличения альвеолярного клиренса и снижения эндотелиальной проницаемости. Данные исследований *in vitro* указывают на то, что S-энантиомер салбутамола может индуцировать мукоцилиарную дисфункцию.

Противовоспалительная активность. В настоящее время имеются доказательства наличия у агонистов β_2 -адrenoцепторов не только бронходилатирующей активности, но и широкого спектра противовоспалительных эффектов, потенциально увеличивающих их клиническое значение в лечении пациентов с бронхообструктивными заболеваниями, имеющими воспалительный компонент. Reiner et al. (2009) в рандомизированном перекрестном эксперименте на здоровых кошках и животных с экспериментально индуцированной бронхиальной астмой, получавших длительно ингаляционно рацемический салбутамол или один из его энантиомеров, установили, что в обеих группах рацемат и S-салбутамол статистически значи-

мо увеличивают клеточность бронхоальвеолярного лаважа ($P = 0,04$ и $P = 0,02$) по сравнению с животными, получавшими R-сальбутамол или плацебо. При этом число эозинофилов в лаваже и активность TNF- α были значимо выше у кошек с бронхиальной астмой, чем у животных, получавших другие исследуемые виды терапии ($P = 0,03$ и $P = 0,004$). У здоровых животных число нейтрофилов в лаваже повышалось на фоне введения рацемата и S-сальбутамола ($P = 0,04$). Таким образом, регулярное ингаляционное введение рацемического сальбутамола или его дистомера, в отличие от R-сальбутамола, у здоровых кошек и животных с бронхиальной астмой ассоциируется с развитием воспалительного процесса.

В экспериментах на мышах с острым IgG- или ЛПС-индуцированным повреждением легких S-сальбутамол значимо ($P < 0,01$ и $P < 0,05$, соответственно) снижал выход альбумина в бронхоальвеолярную жидкость, в то время как R-энантиомер в эквивалентной концентрации оказывал лишь статистически незначимое влияние. Эффект S-сальбутамола сочетался с почти 70% снижением уровня полиморфоядерных клеток в бронхоальвеолярной жидкости ($P < 0,001$ и $P < 0,01$), а также ряда цитокинов, включая CXCL1, MCP-1 (CCL2), TNF- α ($P < 0,05$), играющих ключевую роль в патогенезе острого легочного IgG-индуцированного повреждения. В эксперименте *in vitro* в ЛПС-стимулированных макрофагах перитонеального экссудата, выделенного у мышей, S-сальбутамол значимо редуцировал уровни интерлейкина 6 (IL-6), IL-12, KC, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α и IFN- γ на фоне сопутствующего 31% снижения уровня фосфорилированной JNK. В дополнительном эксперименте установлено, что снижение продукции TNF- α может быть связано как раз с подавлением активации JNK в макрофагах. Подтверждена способность S-сальбутамола почти в два раза стимулировать выброс IL-10 ЛПС-стимулированными макрофагами, известного своей способностью ингибировать экспрессию цитокинов в активированных макрофагах. По данным гистопатологического исследования, у мышей, получавших S-сальбутамол, в некоторых альвеолярных пространствах отмечалось значимо меньшее отложение фибрина и числа эритроцитов (Bosmann et al., 2012).

Также известно, что цАМФ-зависимая сигнальная трансдукция, в том числе ассоциированная с активацией β_2 -адренорецепторов, оказывает негативное модулирующее действие на дегрануляцию эозинофилов человека, активируемую IgG или секреторным IgA. Подавление активации эозинофилов β_2 -агонистами может иметь большое клиническое значение за счет подавления выброса эозинофильных цитотоксических протеинов, промотирующих развитие аллергии и воспаления *in vivo* (Momose et al., 1998). В связи с этим отметим экспериментальную работу Ferrada et al. (2008), в которой установлено, что у мышей с аллергическим воспалением легких, индуцированным сенсибилизацией животных овалбумином, получавших посредством подкожной инфузии R-сальбутамол (200 мкг/100 мкл), отмечалось выраженное, хотя и не значимое по сравнению с контролем, снижение уровней эозинофилов в бронхоальвеолярном лаваже и сывороточного IgE. В активированных спленоцитах мышей только энантиомер индуцировал значимое снижение экспрессии мРНК IL-2 и IL-13, без значимых различий в группах по уровню IL-6. В митоген-активированных Т-клетках в присутствии R-энантиомера снижались уровни мРНК IL-2, IL-13 (значимо), IL-6 (незначимо) и активность NF- κ B (незначимо). В другом исследовании у мышей с экспериментально индуцированной бронхиальной астмой R-сальбутамол значимо редуцировал выход эозинофилов в бронхоальвеолярную жидкость и ткани дыхательных путей, подавлял гиперплазию goblet-клеток и слизистую окклюзию, а также снижал уровни IL-4 в бронхоальвеолярном лаваже и овалбумин-специфического IgE в плазме крови. Несмотря на наличие некоторых из этих позитивных эффектов, S-сальбутамол интенсифицировал отек и реактивность дыхательных путей у животных в ответ на введение метакolina, в то время как

эутомер не оказывал влияния на легочную механику и развитие отека. Вероятно, оба энантиомера сальбутамола редуцируют трафик эозинофилов в верхних дыхательных путях и гиперсекрецию слизи у мышей с бронхиальной астмой, но S-сальбутамол потенцирует развитие отека и гиперреактивности, что может лимитировать клиническую эффективность рацемического сальбутамола (Henderson et al., 2005). Volcheck et al. (2005), в свою очередь, подтвердили наличие у R-сальбутамола противовоспалительной активности. Так, *in vitro* рацемический сальбутамол ингибировал IL-5-активированную продукцию супероксидных радикалов эозинофилами человека. Указанный эффект усиливался в присутствии IBMX – ингибитора фосфодиэстеразы и реверсировался на фоне ICI 118, 551 – селективного антагониста β_2 -адренорецепторов. При обработке клеток только R-энантиомером отмечался аналогичный эффект, достигавший максимума через 60 минут, но исчезающий при более длительном инкубировании. Интересно, что S-сальбутамол в присутствии IBMX не влиял на секрецию супероксида IL-5-активированными клетками в первые 60 мин инкубирования, но значимо ее усиливал в последующий период. S-сальбутамол не оказывал модифицирующего влияния на ингибиторную активность R-энантиомера в составе рацемата. Таким образом, при изолированном применении энантиомеры оказывают разнонаправленные эффекты на выброс провоспалительных медиаторов из активированных эозинофилов человека. Кинетика этих эффектов различна и в случае одновременного введения в составе рацемата, вероятно, активность R-сальбутамола имеет преференциальное значение.

Чуть ранее Baramki et al. (2002) высказали предположение о том, что противовоспалительные эффекты R-энантиомера, реализуемые посредством активации β_2 -адренорецепторов Т-лимфоцитов, могут маскироваться в присутствии S-сальбутамола, в случае введения рацемата *in vivo*. В эксперименте с применением антиген-специфических Т-клеточных линий, обработанных рекомбинантным IL-2 человека и столбнячным токсином, R-сальбутамол значимо ингибировал пролиферацию Т-клеток: в концентрации 10^{-8} моль/л – на $77,0 \pm 9,7\%$ и в концентрации 10^{-7} моль/л – на $61,1 \pm 9,0\%$ по сравнению с контролем. S-сальбутамол при его изолированном применении не оказывал влияния, но в сочетании с эутомером индуцировал дозозависимое увеличение пролиферации клеток. В эквивалентных концентрациях обоих изомеров пролиферация не изменялась по сравнению с контролем, но в концентрации 10^{-6} моль/л S-сальбутамол увеличивал пролиферацию. Антипролиферативное действие эутомера и стимулирующие эффекты комбинации энантиомеров блокировались в присутствии пропранолола. R-сальбутамол в концентрации 10^{-8} подавлял продукцию IL-2 и IFN- γ , но комбинация энантиомеров (10^{-8} /энантиомер) не оказывала влияния на секрецию цитокинов. При сочетанном применении R-энантиомера в концентрации 10^{-8} моль/л с S-сальбутамолом в концентрации 10^{-6} моль/л увеличивалась продукция IL-2 и IL-13. Приведенные данные подтверждают наличие противовоспалительных эффектов R-энантиомера, обусловленных активацией β_2 -адренорецепторов, в то время как рацемат проявляет лишь минимальное влияние на пролиферацию или продукцию цитокинов Т-клетками. Избыточное присутствие S-сальбутамола ассоциируется с его провоспалительными эффектами. Возможно, последний проявляет свойства обратного агониста, переключающего функции β_2 -адренорецепторов.

При этом Chorley et al. (2006) предположили, что острая стимуляция эпителиальных клеток дыхательных путей сальбутамолом может подавлять продукцию и высвобождение провоспалительных медиаторов, в том числе GM-CSF посредством активации iNOS-зависимых каскадов. Исследователи провели эксперимент, в котором первичные культуры клеток бронхиального эпителия подверглись экспозиции коктейлем из цитокинов, включавшем IFN- γ и IL-2 β , с целью индуцирования экспрессии iNOS, после чего в экспериментальную

систему добавлялись R- и S-сальбутамол в качестве рацемической смеси. Экспрессия iNOS значимо и концентрации-зависимо усиливалась в присутствии R-энантиомера с сопутствующим подавлением цитокин-индуцированной экспрессии mPINK и протеина GM-CSF, в то время как дистомер не оказывал влияния. В то же время для интенсификации эффектов iNOS требуется протеинкиназа C (ПКС), индуцирующая транскрипцию iNOS, в частности, ее PKC δ -изоформа. R-сальбутамол активировал экспрессию PKC δ лишь частично и первоначально с последующим снижением уровня энзима по прошествии 6 ч инкубирования, что указывает на активацию iNOS по PKC δ -независимому пути.

Auais et al. (2005) установили, что инфекция дыхательных путей, вызванная респираторным синцитиальным вирусом, у крыс сопровождается развитием нейтрогенного воспаления в нижнем сегменте респираторного тракта. В другом эксперименте на инфицированных крысах исследователи установили, что экстравазация альбумина, вызванная стимуляцией сенсорных нервов капсаицином, подавляется на фоне ингаляционного введения рацемического сальбутамола в дозе 0,63 мг, в то время как в более высоких дозах бронхолитик проявляет лишь минимальный аддитивный эффект. Противовоспалительный эффект R-энантиомера значимо более выражен даже в случае его введения в меньшей дозе (0,31 мг), а в случае введения в высоких дозах нейтрогенная экссудация полностью подавляется. S-сальбутамол не оказывает значимого противовоспалительного действия даже в дозе 1,25 мг, а с повышением дозы проявляет лишь минимальный ингибиторный эффект. Противовоспалительное действие R-сальбутамола реализуется независимо от экспрессии рецепторов substance P neurokinin 1, что указывает на его прямое действие на сосудистую стенку.

Ibe et al. (2008) в эксперименте *in vitro* с применением гладкомышечных клеток человека установили, что, подобно фактору роста тромбоцитов (PDGF) и фактору активации тромбоцитов (PAF), S-сальбутамол стимулирует клеточную пролиферацию, в то время как R-сальбутамол – наоборот. Поскольку PDGF и S-сальбутамол не оказывали аддитивного влияния на эффекты друг друга, вероятно, их пролиферативная активность реализуется посредством разных механизмов. По сравнению с R-энантиомером S-сальбутамол более выраженно индуцировал экспрессию NF- κ B, I κ B α , циклин-зависимых киназ 2 и 4, IL-6, протеина ретинобластомы (pRb) и протеина рецепторов PAF. В присутствии дистомера отмечалось увеличение секреции IL-6, а также устранение ингибиторного влияния эутомера на секрецию цитокина. Приведенные данные подтверждают способность S-сальбутамола стимулировать пролиферацию гладкомышечных клеток посредством интенсификации экспрессии и фосфорилирования внутриклеточных митогенных протеинов и стимуляции секреции IL-6. Индуцирование экспрессии белка PAF-рецепторов доказывает, что S-сальбутамол может оказывать неблагоприятные эффекты посредством связывания с G-протеин-ассоциированными рецепторами, такими, как PAF-рецептор. Позднее упомянутой группой исследователей установлено, что S-сальбутамол может время-зависимо увеличивать связывание PAF с рецептором, коррелирующее с выбросом инозитолтрифосфата, в то время как левосальбутамол и рацемат не оказывают значимых эффектов. Более того, S-сальбутамол интенсифицирует синтез PAF и подавляет его катаболизм (Bae et al., 2012). PAF является важнейшим провоспалительным липидным медиатором, активно вовлекающимся в процессы развития аллергии и воспаления в легких (Roth et al., 1996; Honda et al., 2002). Левосальбутамол в малых концентрациях ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток дыхательных путей человека с сопутствующей активацией цАМФ/ПКА-зависимых внутриклеточных сигнальных каскадов. В присутствии дистомера ингибиторный эффект R-энантиомера устраняется с 65%-снижением продукции цАМФ. Левосальбутамол подавляет экспрессию NF- κ B и pRb. Этот эффект устраняется в присутствии ICI-118551 – селективного блокатора β_2 -адренорецепторов, в то

время как селективный антагонист PAF-рецепторов CV-3988 подавляет пролиферативные эффекты S-сальбутамола и не влияет на активность левосальбутамола, что указывает на различие молекулярных мишеней и разные фармакологические эффекты энантиомеров (Ibe et al., 2006).

Как неоднократно показано в экспериментах, β_2 -адреномиметики, в том числе сальбутамол, могут модулировать функции эпителиоцитов и гладкомышечных клеток дыхательных путей, включая продукцию цитокинов и TGF- β . Последний ассоциируется ремоделированием, иррегуляцией синтеза фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и стимуляцией дифференциации фибробластов в миофибробласты. Frieri and Capetandes (2008) предположили, что S-сальбутамол может индуцировать в микрофибробластах экспрессию VEGF и фибронектина в присутствии экстракта *Dermatophagoides pteronyssinus*. В эксперименте культуру нормальных легочных фибробластов человека стимулировали IL-1 β , TGF- β и экстрактом *D. pteronyssinus* и далее инкубировали с энантиомерами сальбутамола. В присутствии R-сальбутамола (10^{-7} моль) секреция VEGF фибробластами возрастала почти в два раза по сравнению с S-сальбутамолом ($P < 0,05$). Секреция VEGF миофибробластами также возрастала в два раза, но без значимых различий между энантиомерами. S-сальбутамол в концентрациях 10^{-8} – 10^{-4} моль дозозависимо индуцировал повышение уровня mPINK VEGF с параллельным увеличением его секреции. По сравнению с R-энантиомером S-сальбутамол в концентрации 10^{-5} моль индуцировал продукцию фибронектина в миофибробластах, но не в фибробластах, активированную рекомбинантным IL-1 β человека и *D. pteronyssinus*, а в концентрации 10^{-6} – увеличение основного фактора роста фибробластов (bFGF). Таким образом, в концентрации 10^{-6} моль S-сальбутамол, но не R-сальбутамол, может промотировать ангиогенез, увеличивать продукцию фибронектина или bFGF, что, в свою очередь, запускает процесс отложения матрикса и ремоделирования, в частности – при бронхиальной астме.

Противоаллергическое действие. Толерантность клеток-мишеней к β_2 -адренорецептор-зависимым эффектам бронхолитиков обусловлена фосфорилированием β_2 -адренорецепторов, катализируемым цАМФ-зависимой ПКА, а также фосфорилированием под действием киназы G-протеин-ассоциированных рецепторов (GRK), которое, в свою очередь, ведет к присоединению белка β -аррестина и интернализации рецептора (Tran et al., 2004).

Тучные клетки, локализуемые в легких и периферической крови человека, экспрессируют Ca $^{2+}$ -активируемые калиевые каналы (iKCa1), которые активируются по IgE-зависимому пути с развитием гиперполяризации клетки, потенцируемой внутриклеточными токами ионов кальция. Активация β_2 -адренорецепторов, в частности, сальбутамолом (1^{-10} мкмоль), ассоциируется с подавлением токов iKCa1, индуцируемых анти-IgE и блокаторов рецепторов ICI 118551. Экспериментально установлено, что активность каналов iKCa1 регулируется G $_{i/o}$ -протеин-ассоциированными β_2 -адренорецепторами, активация которых в присутствии специфических агонистов оказывает мембраностабилизирующее действие на тучные клетки (Duffy et al., 2005; Wang and Lau, 2006). Chong et al. (2003) установили, что длительная экспозиция тучных клеток сальбутамолом ассоциируется с десенсибилизацией β_2 -адренорецептор-зависимых ответов тучных клеток легких человека, в конечном итоге, приводящих к выбросу гистамина. Причем указанный эффект сальбутамола более выражен по сравнению с таковым у тербуталила, несмотря на эквивалентное редуцирование плотности мембранных β_2 -адренорецепторов, достигающее примерно 25% ($P > 0,05$). Десенсибилизирующая активность в отношении тучных клеток присуща и длительно действующим агонистам β_2 -адренорецепторов (Scola et al., 2004).

Фармакокинетика

Абсорбция и биодоступность. У кроликов после перорального и ректального введения биодоступность сальбута-

мола не превышает 9% и 17%, соответственно, что указывает на наличие более высокой биодоступности салбутамола при ректальном введении и ее снижение в случае введения вещества *per os*, возможно, связанным с эффектом первого пасажа (Kurosawa et al., 1993). Салбутамол подвергается полной локальной абсорбции в двенадцатиперстной кишке, после чего частично метаболизируется в эпителиоцитах слизистой (около 20%), а в последующем – в печени (около 80%). В то же время при ректальном введении у кроликов салбутамол абсорбируется слабо, подвергается минимальному метаболизму в слизистой (4%), а его концентрация в ректальном венозном кровотоке достигает примерно 40% с последующим прохождением вещества через печень (Kurosawa et al., 1993).

У собак в условиях ингаляционного введения R-салбутамола с помощью небулайзера регистрируется два четко выраженных пика концентрации энантиомера в плазме крови (C_{max}), при этом около 67% R-салбутамола от ингаляционной дозы поступает из кишечника. Таким образом, у собак абсорбция R-энантиомера носит двухфазный характер, обусловленный первичным всасыванием энантиомера из кишечника и позднее – из легких (Aucclair et al., 2000).

Распределение и связывание с протеинами плазмы крови. Это связывание с протеинами плазмы крови и тканевое распределение хиральных субстанций носит стереоселективный характер, что, в конечном итоге, может оказывать существенное влияние не только на их общий фармакокинетический профиль, но и на характер фармакологических эффектов (Shen et al., 2013). Еще до недавнего времени отсутствовали данные об энантиоселективности фармакокинетики изомеров салбутамола в легочной ткани. Jacobson et al. (2017) провели исследование, в рамках которого с применением техники tandemной сверхэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией оценили концентрации энантиомеров салбутамола по прошествии 2, 5, 10 и 15 минут, в центральных (эндоскопия бронхов) и периферических сегментах легких (чрескожная легочная биопсия) у лошадей ($n = 12$) через 20 и 25 мин после ингаляционного введения рацемата в дозе 1000 мкг соответственно, а также в образцах плазмы крови. Концентрация салбутамола в бронхоальвеолярной жидкости составила в среднем 57 ± 10 мкг (ДИ 95%), в то время как начальные средние уровни R- и S-салбутамола – 389 ± 189 и 378 ± 177 нг/г соответственно, которые снижались почти на 50% по прошествии 15 мин после ингаляции. Средние значения концентраций R- и S-салбутамола в центральном сегменте легких были значимо выше в сравнении с таковыми периферической части и составили соответственно 875 ± 945 против 49 ± 12 нг/г и 877 ± 955 против 51 ± 12 нг/г. Энантиоспецифичность фармакокинетического профиля салбутамола характерна при его распределении в бронхоальвеолярном лаваже и в тканях центральной части легких, а минимальная (~2%) энантиоселективность характерна для периферических сегментов легких. Наличие энантиоселективности фармакокинетики салбутамола подтверждено при распределении салбутамола в плазме крови: соотношения S- и R-салбутамола при определении параметров $AUC_{0-25 \text{ мин}}$ и C_{max} составили 1,25 и 1,14 соответственно.

Биотрансформация. Mohammed et al. (2000) в эксперименте на морских свинках с гистамин-индуцированной бронхоконстрикцией установили, что способ введения бронхолитика имеет критическое значение для получения персистирующего терапевтического действия. После однократного ингаляционного введения бронхолитического эффект салбутамола (1 мг/кг) у животных сохранялся в течение одного часа, а в случае внутривенного введения – не более 30 минут. Пролонгирование терапевтического эффекта салбутамола в случае его ингаляционной доставки, как минимум, отчасти может быть обусловлено снижением «потерь» фармакологически активной субстанции в ходе метаболизма в печени, а также менее интенсивной биотрансформацией ее в тканях респираторной системы. В рамках сравнительного исследования, про-

водившегося Arroyo et al. (2016), у лошадей с рекуррентной обструкцией дыхательных путей в условиях ингаляционного введения с помощью небулайзера продолжительность бронходилатирующего действия салбутамола составила 60 минут, левосалбутамола – 120 минут.

Eaton et al. (1996) изучили процесс сульфатирования салбутамола и его энантиомеров в гомогенате клеток легких и бронхиальных эпителиоцитов (BEAS-2B) человека. Как оказалось, в легких внутренний клиренс (V_{max}/K_m) R-салбутамола почти в 11 раз превышает таковой для S-салбутамола ($0,49 \pm 0,32$ мл/мин·г протеина против $0,046 \pm 0,028$ мл/мин·г протеина), что обусловлено существенными различиями K_m , которые в 16 раз выше для S-энантиомера (1300 ± 170 против 83 ± 12 мкмоль). Кинетика метаболизма энантиомеров салбутамола в клетках BEAS-2B аналогична, хотя в целом интенсивность сульфатирования ниже. В то же время, по данным Nakpheng et al. (2017), *in vitro* в экстракционной среде, внутриклеточной жидкости и лизате клеток легочной ткани метаболиты салбутамола не детектируются, а значение соотношения S/R-энантиомеров во всех клеточных фракциях варьируют в пределах 0,99–1,10, независимо от фазы клеточного цикла и концентрации бронхолитика. Последнее указывает на отсутствие стереоселективного распределения и механизмов биотрансформации салбутамола в легочной ткани.

В метаболизме салбутамола главную роль играют цитозольные сульфотрансферазы (SULT), которые принадлежат семейству детоксицирующих энзимов II фазы и катализируют сульфатирование нативных и экзогенных гидрофобных молекул (Suiko et al., 2017). Флавоноиды могут выступать в качестве ингибиторов SULT1A1 и подавлять сульфатирование ксенобиотиков как в печени, так и в кишечнике, о чем следует иметь в виду в случае терапии салбутамолом и левосалбутамолом с сопутствующим потреблением флавоноидсодержащих пищевых продуктов (De et al., 2000; Marchetti et al., 2001; De et al., 2002). Кверцетин ингибирует сульфатирование R-салбутамола, причем интенсивность ингибиторного действия на один – два порядка выше в двенадцатиперстной кишке по сравнению с печенью (Pacifci, 2004). В результате S-салбутамола более длительный период персистирует в организме и достигает значимо более высоких концентраций в плазме крови по сравнению с R-энантиомером (Sjöswärd et al., 2003). SULT1A3 относительно резистентен к ингибиторным эффектам мефеновой кислоты, салициловой кислоты и кверцетина (Pacifci, 2004). Мефеновая и салициловая кислоты также являются ингибиторами SULT1A1 (Vietri et al., 2001, 2002) и могут подавлять сульфатирование R-салбутамола в печени (Vietri et al., 2000).

По данным Martin et al. (1971), ^3H -меченый салбутамол подвергается быстрой гастроинтестинальной абсорбции у крыс, кроликов, собак и человека. При этом, в зависимости от вида, уровень радиоактивности в моче в течение 24 ч после однократного введения достигает 60–90%, из которых 70–90% у собак обусловлены неизменным веществом, 90% у кроликов и 40% у крыс ^3H -салбутамол-о-фенилглюкуронидом, не обладающим β_2 -агонистической или β_2 -антагонистической активностью. У крыс глюкуронид ^3H -салбутамола, образуемый в печени, экскретируется также с желчью. Уровень экскреции глюкуронида с калом у крыс в течение 0–48 ч после введения может достигать 25–40% от введенной дозы радиоактивно меченого бронхолитика. С учетом данных анализа распределения у крыс и собак салбутамол подвергается полной экскреции из организма, не проявляя способности к кумуляции. В условиях ингаляционного введения в форме аэрозоля у собак и человека ^3H -меченый салбутамол медленно абсорбируется в системный кровоток из тканей легких и в конечном итоге элиминируется с мочой.

Согласно экспериментальным данным Klaassen et al. (1998), уровень экспрессии мРНК SULT1A1 в печени половозрелых крыс, играющий ключевую роль в метаболизме простых фенолов у животных и человека, почти в два раза выше у самцов,

чем у самок. Значимые различия уровня мРНК SULT1A1 обусловлены выраженным снижением ее экспрессии у самок после полового созревания. У животных обоего пола, подвергнутых гипофизэктомии, экспрессия мРНК снижается в равной степени, при этом заместительная терапия гормоном роста не ассоциируется с восстановлением экспрессии мРНК SULT1A1. Таким образом, приведенные данные могут указывать на наличие зависимости интенсивности метаболической биоконверсии салбутамола от пола. Значимо более интенсивная экспрессия мРНК SULT1A1 у крыс-самцов регистрируется и в других тканях, включая головной мозг, легкие, сердце, кишечник, почки, надпочечники, тестикулы и селезенку. Интересно, что у крыс-самцов, подвергнутых парциальной гепатэктомии, отмечалась лишь тенденция к некоторому снижению экспрессии мРНК SULT1A1, сходная с изменениями регистрировавшимися в экспериментах с применением других быстро пролиферирующих тканей (в частности, злокачественных опухолей и тканей неполовозрелых животных) (Dunn et al., 1999).

Хиральная инверсия. Нередко при применении энантимерно чистых субстанций в организме происходит их хиральная инверсия в соответствующие дистомеры, не только проявляющие иной фармакокинетический и фармакодинамический профиль, но и несущие токсический потенциал. Красноречивым примером хиральной инверсии и ее потенциально неблагоприятного клинического значения у человека является талидомид, энантимеры которого быстро подвергаются рацемизации *in vivo* и ассоциируются с хорошо известными тератогенными эффектами талидомида (Zhou et al., 2015).

Ko et al. (2012) в эксперименте *in vitro* с применением культуры клеток гепатомы человека HepG2 подтвердили роль сульфатирования в печени как основного механизма биотрансформации салбутамола у человека, оценивавшегося по интенсивности генерации ³⁵S-меченого сульфата. В ходе тестирования специфической активности 11 рекомбинантных изоформ SULT человека установлено, что SULT1A3 играет преференциальную роль в метаболизме и детоксикации салбутамола. При этом салбутамол оказывает концентрацию-зависимое ингибирование метаболизма дофамина. По мнению исследователей, в высоких дозах салбутамол может интерферировать с гомеостазом дофамина и, возможно, других катехоламинов *in vivo*. В эксперименте с применением цитозольных и S₉ фракций, полученных из образцов тканей легких, печени, почек и сегмента тонкого кишечника человека, установлено, что скорость интестинальной биотрансформации максимальна по сравнению со скоростью в других тканях.

Ранее установлено, что при ингаляционном введении у собак и человека феномен взаимной хиральной инверсии энантимеров для салбутамола не характерен (Fried et al., 1998; Auclair et al., 2000). В то же время, по данным Boulton and Fawcett (2001), после перорального или ингаляционного введения энантимерно чистого салбутамола около 6% вещества подвергается конверсии в другой энантимер, что, как предполагается, связано с рацемизацией, катализируемой кислой средой в желудке.

Экскреция. У кроликов после перорального и ректального введения общий уровень экскреции салбутамола и его глюкуронида с мочой по прошествии 10 ч после введения составляет около 77% и 10%, соответственно (Kurosawa et al., 1993).

Выводы

Данные доклинических исследований указывают на преимущества R-энантиомера салбутамола перед рацемическим салбутамолом и его S-изомером. Это проявляется в значительно большем аффинитете (в 90–100 раз) левосалбутамола в отношении β₁- и β₂-адренорецепторов по сравнению с его дистомером. При этом эффективность левосалбутамола эквивалентна таковой у салбутамола, в то время как продолжительность действия энантимерно чистой субстанции R-салбутамола как минимум в два раза выше по сравнению с рацематом.

Для R-салбутамола не характерен феномен развития гиперреактивности дыхательных путей, который может развиваться при применении рацемического салбутамола. Важно обратить внимание на то, что главную роль в аномальном, на первый взгляд, увеличении тонуса бронхов играет S-энантимер салбутамола. Важная способность рацемического салбутамола – увеличивать мукоцилиарный клиренс – у левосалбутамола выражена практически в два раза сильнее. Это свидетельствует о том, что позитивные эффекты рацемического салбутамола на мукоцилиарный клиренс обусловлены присутствием в его составе R-энантиомера. Левосалбутамол, в отличие от дистомера, способен оказывать противовоспалительное действие, которое выражается в уменьшении количества эозинофилов и нейтрофилов в бронхоальвеолярном лаваже, уровня полиморфоядерных клеток в бронхоальвеолярной жидкости и ряда цитокинов, включая CXCL1, MCP-1 (CCL2), TNF-α, играющих ключевую роль в патогенезе острого легочного IgG-индуцированного повреждения. R-салбутамол способен подавлять гиперплазию goblet-клеток и слизистую окклюзию дыхательных путей, а также уменьшать уровни IL-4 в бронхоальвеолярном лаваже и овальбумин-специфического IgE в плазме крови экспериментальных животных. В свою очередь, S-салбутамол проявляет противоположные свойства и способен усиливать воспалительную реакцию.

В связи с тем, что рацемический салбутамол подвергается стереоселективному метаболизму с активным сульфатированием R-изомера и закономерным накоплением токсичного дистомера в организме, видится разумным применение гомохирального ингаляционного препарата на основе левосалбутамола. Таким образом, гомохиральные препараты на основе R-салбутамола (левосалбутамола) могут быть более эффективными и безопасными в качестве бронхолитиков в сравнении с рацематом.

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» в рамках комплексного проекта «Создание высокотехнологичного производства жизненно важного лекарственного противоастматического препарата «Салбутамол» в аэрозольной форме на основе энантимерно чистой, микронизированной субстанции, получаемой с помощью сверхкритических флюидных технологий» (договор № 03.G25.31.0273 от 29 мая 2017 г.).

References

- Agrawal, D., Ariyaratna, K., & Kelbe, P. (2004). S-Albuterol activates pro-constrictory and pro-inflammatory pathways in human bronchial smooth muscle cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(3), 503–510.
- Ameredes, B. T., & Calhoun, W. J. (2006). R-Albuterol for asthma: Pro [a.k.a. S-Albuterol for Asthma: Con]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174, 965–974.
- Ameredes, B. T., & Calhoun, W. J. (2010). Albuterol enantiomers: Pre-clinical and clinical value? *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 2, 1081–1092.
- Angulo, M., Taranto, E., Soto, J. P., Malacrida, L., Nin, N., Hurtado, F. J., & Piriz, H. (2009). Salbutamol improves diaphragmatic contractility in chronic airway obstruction. *Archivos de Bronconeumología*, 45(5), 230–234.
- Arrowsmith, J. (2011). Trial watch: Phase II failures: 2008–2010. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(5), 328–329.
- Arrowsmith, J. (2011). Trial watch: Phase III and submission failures: 2007–2010. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(2), 87.
- Arroyo, M., Couët, L., Nogradi, N., Kamarudin, M., & Ivester, K. (2016). Efficacy of inhaled levalbuterol compared to albuterol in horses with recurrent airway obstruction. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(4), 1333–1337.
- Auais, A., Wedde-Beer, K., & Piedimonte, G. (2005). Anti-inflammatory effect of albuterol enantiomers during respiratory syncytial virus infection in rats. *Pediatric Pulmonology*, 40(3), 228–234.
- Auclair, B., Wainer, I., Fried, K., Koch, P., Jerussi, T., & Ducharme, M. (2000). A population analysis of nebulized (R)-albuterol in dogs using a novel mixed gut-lung absorption PK-PD model. *Pharmaceutical Research*, 17(10), 1228–1235.
- Bae, R., Arteaga, A., Raj, J., & Ibe, B. (2012). Albuterol isomers modulate platelet-activating factor synthesis and receptor signaling in human bronchial

- smooth muscle cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, 158(1), 18–26.
- Baramki, D., Koester, J., Anderson, A., & Borish, L. (2002). Modulation of T-cell function by R- and S-isomers of albuterol: Anti-inflammatory influences of R-isomers are negated in the presence of the S-isomer. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(3), 449–454.
- Barnette, D., Johnson, B., Pouncey, D., Nshimiyimana, R., Desrochers, L., Goodwin, T., & Miller, G. (2017). Stereospecific metabolism of R- and S-warfarin by human hepatic cytosolic reductases. *Drug Metabolism and Disposition*, 45(9), 1000–1007.
- Berger, W. E. (2003). Levalbuterol: Pharmacologic properties and use in the treatment of pediatric and adult asthma. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 90(6), 583–591.
- Blin, O. (2004). Chiral switch: Towards a better benefit-risk ratio? *Therapie*, 59(6), 625–628.
- Bosak, A., Knežević, A., Gazić, S. I., Šinko, G., & Kovarik, Z. (2017). Resorcinol-, catechol- and saligenin-based bronchodilating β_2 -agonists as inhibitors of human cholinesterase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 789–797.
- Boskabady, M. H., & Aslani, M. R. (2007). Influence of epithelium on β -adrenoceptor desensitization of guinea pig tracheal smooth muscle. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 156(1), 69–78.
- Bosmann, M., Grailer, J., Zhu, K., Matthay, M., Sarma, J., Zetoune, F., & Ward, P. (2012). Anti-inflammatory effects of β_2 adrenergic receptor agonists in experimental acute lung injury. *The FASEB Journal*, 26(5), 2137–2144.
- Boulton, D. W., & Fawcett, J. P. (2001). The pharmacokinetics of levosalbutamol: What are the clinical implications? *Clinical Pharmacokinetics*, 40(1), 23–40.
- Boulton, D. W., & Fawcett, J. P. (2002). β_2 -agonist eutomers: A rational option for the treatment of asthma? *American Journal of Respiratory Medicine*, 1(5), 305–311.
- Broadley, K. J. (2006). β -adrenoceptor responses of the airways: For better or worse? *European Journal of Pharmacology*, 533(1–3), 15–27.
- Buchheit, K. H., Hofmann, A., & Fozard, J. R. (1995). Salbutamol-induced airway hyperreactivity in guinea pigs is not due to a loss of its bronchodilator effect. *European Journal of Pharmacology*, 287(1), 85–88.
- Burke, D., & Henderson, D. J. (2002). Chirality: A blueprint for the future. *British Journal of Anaesthesia*, 88(4), 563–576.
- Calcaterra, A., & D'Acquarica, I. (2017). The market of chiral drugs: Chiral switches versus *de novo* enantiomerically pure compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, S0731–7085(17), 31483–31488.
- Cazzola, M., Page, C., Calzetta, L., & Matera, G. (2012). Pharmacology and the therapeutics of bronchodilators. *Pharmacological Reviews*, 64, 450–504.
- Chong, L., Suvama, K., Chess-Williams, R., & Peachell, P. (2003). Desensitization of β_2 -adrenoceptor-mediated responses by short-acting β_2 -adrenoceptor agonists in human lung mast cells. *British Journal of Pharmacology*, 138(3), 512–520.
- Chorley, B., Li, Y., Fang, S., Park, J., & Adler, K. (2006). R-albuterol elicits anti-inflammatory effects in human airway epithelial cells via iNOS. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(1), 119–127.
- Cockcroft, D., Davis, B., Swystun, V., & Marciniuk, D. (1999). Tolerance to the bronchoprotective effect of β_2 -agonists: Comparison of the enantiomers of salbutamol with racemic salbutamol and placebo. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(6), 1049–1053.
- Cooper, P. R., & Panettieri, R. A. Jr. (2008). Steroids completely reverse albuterol-induced $\beta(2)$ -adrenergic receptor tolerance in human small airways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(4), 734–740.
- Cooper, P., Kurten, R., Zhang, J., Nicholls, D., Dainty, I., & Panettieri, R. (2011). Formoterol and salmeterol induce a similar degree of β_2 -adrenoceptor tolerance in human small airways but via different mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 163(3), 521–532.
- Costello, J. (1999). Prospects for improved therapy in chronic obstructive pulmonary disease by the use of levalbuterol. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(2Pt2), S61–68.
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F., Rane, A., & Pacifici, G. M. (2002). Inhibition of phenol sulfotransferase (SULT1A1) by quercetin in human adult and foetal livers. *Xenobiotica*, 32(5), 363–368.
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., & Pacifici, G. (2000). Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica*, 30(9), 857–866.
- Delmotte, P., & Sanderson, M. J. (2008). Effects of albuterol isomers on the contraction and Ca^{2+} signaling of small airways in mouse lung slices. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38, 524–531.
- Derom, E., Gayan-Ramirez, G., Gurrieri, G., de Bock, V., & Decramer, M. (1997). Bixaterol increases force output of fatigued canine diaphragm more than salbutamol. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155(1), 181–185.
- Duffy, S., Cruse, G., Lawley, W., & Bradding, P. (2005). β_2 -adrenoceptor regulation of the K^+ channel iKCa1 in human mast cells. *The FASEB Journal*, 19(8), 1006–1008.
- Dunn, R., Kolaja, K., & Klaassen, C. (1999). Effect of partial hepatectomy on the expression of seven rat sulphotransferase mRNAs. *Xenobiotica*, 29(6), 583–593.
- Eaton, E., Walle, U., Wilson, H., Aberg, G., & Walle, T. (1996). Stereoselective sulphate conjugation of salbutamol by human lung and bronchial epithelial cells. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 41(3), 201–206.
- Esau, S. A. (1989). Hypoxic, hypercapnic acidosis decreases tension and increases fatigue in hamster diaphragm muscle *in vitro*. *The American Review of Respiratory Disease*, 139(6), 1410–1417.
- Ferrada, M., Gordon, E., Jen, K., He, H., Lu, X., Barone, L., & Finn, P. W. (2008). (R)-albuterol decreases immune responses: Role of activated T cells. *Respiratory Research*, 9(1), 3.
- Fried, K., Koch, P., & Wainer, I. (1998). Determination of the enantiomers of albuterol in human and canine plasma by enantioselective high-performance liquid chromatography on a teicoplanin-based chiral stationary phase. *Chirality*, 10(5), 484–491.
- Frieri, M., & Capetandes, A. (2008). The effect of enantiomers of β -agonists on myofibroblast-derived vascular endothelial growth factor and other matrix components in the presence of dust-mite extract. *Allergy and Asthma Proceedings*, 29(2), 182–188.
- Frohock, J., Wijkstrom-Frei, C., & Salathe, M. (2002). Effects of albuterol enantiomers on ciliary beat frequency in ovine tracheal epithelial cells. *Journal of Applied Physiology*, 92(6), 2396–2402.
- Gashaw, I., Ellinghaus, P., Sommer, A., & Asadullah, K. (2012). What makes a good drug target? *Drug Discovery Today*, 17(Suppl.), S24–30.
- Gaskell, H., Derry, S., Wiffen, P., & Moore, R. (2017). Single dose oral ketoprofen or dexketoprofen for acute postoperative pain in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* (CD007355).
- Günay, S., Saraydin, M., & Yilmaz, D. N. (2016). New bronchodilators and combinations in COPD treatment. *Tuberkuloz Ve Toraks*, 64(3), 240–245.
- Gutierrez-Climente, R., Gomez-Caballero, A., Guerreiro, A., Garcia-Mutio, D., Unceta, N., Goicolea, M., & Barrio, R. (2017). Molecularly imprinted nanoparticles grafted to porous silica as chiral selectors in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1508, 53–64.
- Handley, D. (1999). The asthma-like pharmacology and toxicology of S-isomers of β agonists. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(2Pt2), S69–76.
- Handley, D. A., Morley, J., & Vaickus, L. (1998). Levalbuterol hydrochloride. Expert opinion on investigational drugs, 7(12), 2027–2041.
- Handley, D., McCullough, J., Crowther, S., & Morley, J. (1998). Sympathomimetic enantiomers and asthma. *Chirality*, 10(3), 262–272.
- Hauck, R., Harth, M., Schulz, C., Präuer, H., Böhm, M., & Schömig, A. (1997). Effects of β_2 -agonist- and dexamethasone-treatment on relaxation and regulation of β -adrenoceptors in human bronchi and lung tissue. *British Journal of Pharmacology*, 121(8), 1523–1530.
- Henderson, W., Banerjee, E., & Chi, E. (2005). Differential effects of S- and R-enantiomers of albuterol in a mouse asthma model. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(2), 332–340.
- Herepath, M. L., & Broadley, K. J. (1992). Resistance of β_2 -adrenoceptor-mediated responses of lung strips to desensitization by long-term agonist exposure-comparison with atrial β_1 -adrenoceptor-mediated responses. *European Journal of Pharmacology*, 215(2–3), 209–219.
- Honda, Z., Ishii, S., & Shimizu, T. (2002). Platelet-activating factor receptor. *Journal of Biochemistry*, 131(6), 773–779.
- Ibe, B. O., Abdallah, M. F., & Raj, J. U. (2008). Mechanisms by which S-albuterol induces human bronchial smooth muscle cell proliferation. *International Archives of Allergy and Immunology*, 146(4), 321–333.
- Ibe, B., Portugal, A., & Raj, J. (2006). Levalbuterol inhibits human airway smooth muscle cell proliferation: Therapeutic implications in the management of asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 139(3), 225–236.
- Ito, T., Fujimura, N., Omote, K., & Namiki, A. (2006). A selective β_2 -adrenergic agonist, terbutaline, improves sepsis-induced diaphragmatic dysfunction in the rat. *Life Sciences*, 79(9), 905–912.
- Jacobson, G., Raidal, S., Robson, K., Narkowicz, C., Nichols, D., & Haydn, W. E. (2017). Bronchopulmonary pharmacokinetics of R-salbutamol and S-salbutamol enantiomers in pulmonary epithelial lining fluid and lung tissue of horses. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(7), 1436–1445.
- Jantikar, A., Brashier, B., Maganji, M., Raghupathy, A., Mahadik, P., Gokhale, P., & Salvi, S. (2007). Comparison of bronchodilator responses of levosalbutamol and salbutamol given via a pressurized metered dose inhaler: A randomized, double blind, single-dose, crossover study. *Respiratory Medicine*, 101(4), 845–849.
- Javaheri, S., Smith, J., Thomas, J., Guilfoile, T., & Donovan, E. (1988). Albuterol has no effect on diaphragmatic fatigue in humans. *The American Review of Respiratory Disease*, 137(1), 197–201.

- Keir, S., Page, C., & Spina, D. (2002). Bronchial hyperresponsiveness induced by chronic treatment with albuterol: Role of sensory nerves. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(3), 388–394.
- Klaassen, C., Liu, L., & Dunn, R. (1998). Regulation of sulfotransferase mRNA expression in male and female rats of various ages. *Chemico-Biological Interactions*, 109, 299–313.
- Ko, K., Kurogi, K., Davidson, G., Liu, M., Sakakibara, Y., Suiko, M., & Liu, M. (2012). Sulfation of ractopamine and salbutamol by the human cytosolic sulfotransferases. *Journal of Biochemistry*, 152(3), 275–283.
- Kubinyi, H. (2002). Chemical similarity and biological activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13(6), 717–726.
- Kuchay, M. S., & Mithal, A. (2017). Levosulpiride and serum prolactin levels. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 21(2), 355.
- Kurosawa, N., Morishima, S., Owada, E., & Ito, K. (1993). Comparison of bioavailability of salbutamol between oral and rectal administration in rabbits. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 113(4), 321–326.
- Kurosawa, N., Owada, E., & Ito, K. (1993). Absorption and first-pass-effect of salbutamol after intraduodenal and intrarectal administration in rabbits. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 113(10), 698–704.
- Lemoine, H., Overlack, C., Köhl, A., Worth, H., & Reinhardt, D. (1992). Formoterol, fenoterol, and salbutamol as partial agonists for relaxation of maximally contracted guinea pig tracheae: Comparison of relaxation with receptor binding. *Lung*, 170(3), 163–180.
- Li, L., Cheng, B., Zhou, R., Cao, Z., Zeng, C., & Li, L. (2017). Preparation and evaluation of a novel N-benzyl-phenethylamino- β -cyclodextrin-bonded chiral stationary phase for HPLC. *Talanta*, 174, 179–191.
- Li, L., Wu, C., Ma, Y., Zhou, S., Li, Z., & Sun, T. (2017). Effectively enhancing the enantioseparation ability of β -cyclodextrin derivatives by de novo design and molecular modeling. *Analyst*, 142(19), 3699–3706.
- Liu, Y., Deng, M., Yu, J., Jiang, Z., & Guo, X. (2016). Capillary electrophoretic enantioseparation of basic drugs using a new single-isomer cyclodextrin derivative and theoretical study of the chiral recognition mechanism. *Journal of Separation Science*, 39(9), 1766–1775.
- Marchetti, F., De, S. C., Vietri, M., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F. (2001). Differential inhibition of human liver and duodenum sulphotransferase activities by quercetin, a flavonoid present in vegetables, fruit and wine. *Xenobiotica*, 31(12), 841–847.
- Martin, L., Hobson, J., Page, J., & Harrison, C. (1971). Metabolic studies of salbutamol-3H: A new bronchodilator, in rat, rabbit, dog and man. *European Journal of Pharmacology*, 14(2), 183–199.
- Matera, M., Calzetta, L., Rogliani, P., Bardaro, F., Page, C., & Cazzola, M. (2011). Evaluation of the effects of the R- and S-enantiomers of salbutamol on equine isolated bronchi. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 24(2), 221–226.
- Mazzoni, L., Naef, R., Chapman, I., & Morley, J. (1994). Hyperresponsiveness of the airways following exposure of guinea-pigs to racemic mixtures and distomers of β_2 -selective sympathomimetics. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 7(6), 367–376.
- McAuley, D., Frank, J., Fang, X., & Matthay, M. (2004). Clinically relevant concentrations of β_2 -adrenergic agonists stimulate maximal cyclic adenosine monophosphate-dependent airspace fluid clearance and decrease pulmonary edema in experimental acid-induced lung injury. *Critical Care Medicine*, 32(7), 1470–1476.
- Milgrom, H. (2006). Levosalbutamol in the treatment of asthma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 7(12), 1659–1668.
- Mitra, S., Ugur, M., Ugur, O., Goodman, H., McCullough, J., & Yamaguchi, H. (1998). S-Albuterol increases intracellular free calcium by muscarinic receptor activation and a phospholipase C-dependent mechanism in airway smooth muscle. *Molecular Pharmacology*, 53(3), 347–354.
- Mohammed, S. P., Taylor, C. V., Weyman-Jones, C. B., Mather, M. E., Vendy, K., Dougall, I. G., & Young, A. (2000). Duration of action of inhaled vs. intravenous β_2 -adrenoceptor agonists in an anaesthetized guinea-pig model. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 13(6), 287–292.
- Momose, T., Okubo, Y., Horie, S., Suzuki, J., Isobe, M., & Sekiguchi, M. (1998). Effects of intracellular cyclic AMP modulators on human eosinophil survival, degranulation and CD11b expression. *International Archives of Allergy and Immunology*, 117(2), 138–145.
- Nakpheng, T., Songkarak, S., Suwandecha, T., Sriharadol, R., Chunhachaichana, C., & Srichana, T. (2017). Evidences for salbutamol metabolism by respiratory and liver cell lines. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 32(2), 127–134.
- Nelson, H. S. (1999). Clinical experience with levalbuterol. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(2Pt2), S77–84.
- Noguchi, S., Nishimura, T., Mukaida, S., Benet, L., Nakashima, E., & Tomi, M. (2017). Cellular uptake of levocetirizine by organic anion transporter 4. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(9), 2895–2898.
- Nowak, R. (2003). Single-isomer levalbuterol: A review of the acute data. *Current Allergy and Asthma Reports*, 3(2), 172–178.
- Pacifici, G. M. (2004). Inhibition of human liver and duodenum sulfotransferases by drugs and dietary chemicals: A review of the literature. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 42(9), 488–495.
- Page, C. P., & Morley, J. (1999). Contrasting properties of albuterol stereoisomers. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(2Pt2), S31–41.
- Penn, R., Frielle, T., McCullough, J., Aberg, G., & Benovic, J. (1996). Comparison of R-, S-, and RS-albuterol interaction with human β_1 - and β_2 -adrenergic receptors. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 14(1), 37–45.
- Pfütz, H., Nin, N., Boggia, J., Angulo, M., & Hurtado, F. J. (2008). Salbutamol improves diaphragm force generation in experimental sepsis. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, 44(3), 135–139.
- Reinero, C., Delgado, C., Spinka, C., DeClue, A., & Dhand, R. (2009). Enantiomer-specific effects of albuterol on airway inflammation in healthy and asthmatic cats. *International Archives of Allergy and Immunology*, 150(1), 43–50.
- Roth, M., Nauck, M., Yousefi, S., Tamm, M., Blaser, K., Perruchoud, A. (1996). Platelet-activating factor exerts mitogenic activity and stimulates expression of interleukin 6 and interleukin 8 in human lung fibroblasts via binding to its functional receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(1), 191–201.
- Sabater, J., Lee, T., & Abraham, W. (2005). Comparative effects of salmeterol, albuterol, and ipratropium on normal and impaired mucociliary function in sheep. *Chest*, 128(5), 3743–3749.
- Sardella, R., Ianni, F., Di Michele, A., Di Capua, A., Carotti, A., Anzini, M., & Natalini, B. (2017). Enantioresolution and stereochemical characterization of two chiral sulfoxides endowed with COX-2 inhibitory activity. *Chirality*, 29(9), 536–540.
- Scola, A., Chong, L., Suvama, S., Chess-Williams, R., & Peachell, P. (2004). Desensitisation of mast cell β_2 -adrenoceptor-mediated responses by salmeterol and formoterol. *British Journal of Pharmacology*, 141(1), 163–171.
- Shen, Q., Wang, L., Zhou, H., Jiang, H., Yu, L., & Zeng, S. (2013). Stereoselective binding of chiral drugs to plasma proteins. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(8), 998–1006.
- Sjöswärd, K. N., Josefsson, M., Ahlner, J., Andersson, R. G., & Schmekel, B. (2003). Metabolism of salbutamol differs between asthmatic patients and healthy volunteers. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 92(1), 27–32.
- Soriano-Ursúa, M., Trujillo-Ferrara, J., Alvarez-Cedillo, J., & Correa-Basurto, J. (2010). Docking studies on a refined human β_2 adrenoceptor model yield theoretical affinity values in function with experimental values for R-ligands, but not for S-antagonists. *Journal of Molecular Modeling*, 16(3), 401–409.
- Stank, A., Kokh, D., Fuller, J., & Wade, R. (2016). Protein binding pocket dynamics. *Accounts of Chemical Research*, 49(5), 809–815.
- Suiko, M., Kurogi, K., Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., & Liu, M. (2017). Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(1), 63–72.
- Theron, A., Steel, H., Tintinger, G., Feldman, C., & Anderson, R. (2013). Can the anti-inflammatory activities of β_2 -agonists be harnessed in the clinical setting? *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 1387–1398.
- Tran, T., Friedman, J., Qunaibi, E., Baameur, F., Moore, R., & Clark, R. (2004). Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. *Molecular Pharmacology*, 65(1), 196–206.
- Uzuki, M., Yamakage, M., Fujimura, N., & Namiki, A. (2006). Preferable inotropic action of procaterol, a potent bronchodilator, on impaired diaphragmatic contractility in an intraabdominal septic model. *Journal of Anesthesia*, 20(2), 145–148.
- Uzuki, M., Yamakage, M., Fujimura, N., & Namiki, A. (2007). Direct inotropic effect of the β_2 -receptor agonist terbutaline on impaired diaphragmatic contractility in septic rats. *Heart and Lung: The Journal of Acute and Critical Care*, 36(2), 140–147.
- Väitalo, P. A., Kempainen, H., Kulo, A., Smits, A., Calsteren, K., Olkkola, K. T., & Allegaert, K. (2017). Body weight, gender and pregnancy affect enantiomer - specific ketorolac pharmacokinetics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(9), 1966–1975.
- Van der Heijden, H., Dekhuijzen, P., Folgering, H., & van Herwaarden, C. (1997). Inotropic effects of salbutamol on rat diaphragm contractility are potentiated by foreshortening. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155(3), 1072–1079.
- Vietri, M., Pietrabissa, A., Mosca, F., Rane, A., & Pacifici, G. (2001). Human adult and foetal liver sulphotransferases: Inhibition by mefenamic acid and salicylic acid. *Xenobiotica*, 31(3), 153–161.
- Vietri, M., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., & Pacifici, G. (2000). Differential inhibition of hepatic and duodenal sulfation of (-)-salbutamol and minoxidil by mefenamic acid. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 56(5–6), 477–479.

- Vietri, M., Vaglini, F., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., & Pacifici, G. (2002). Sulfation of R(-)-apomorphine in the human liver and duodenum, and its inhibition by mefenamic acid, salicylic acid and quercetin. *Xenobiotica*, 32(7), 587–594.
- Volcheck, G., Kelkar, P., Bartemes, K., Gleich, G., & Kita, H. (2005). Effects of R- and S-isomers of β -adrenergic agonists on eosinophil response to interleukin-5. *Clinical and Experimental Allergy*, 35(10), 1341–1346.
- Wang, X. S., & Lau, H. Y. (2006). β -adrenoceptor-mediated inhibition of mediator release from human peripheral blood-derived mast cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(8), 746–750.
- Westerhof, F., Zuidhof, A., Kok, L., Meurs, H., & Zaagsma, J. (2005). Effects of salbutamol and enantiomers on allergen-induced asthmatic reactions and airway hyperreactivity. *European Respiratory Journal*, 25, 864–872.
- Xu, X., Zhou, J., Yang, Q., Fang, L., Xie, Q., & Shen, Y. (2006). An *in vitro* rat diaphragmatic fatigue model induced by combined hypoxic and hypercapnic acidosis and the effect of salmeterol. *Pharmacological Research*, 53(2), 171–176.
- Yao, Y., Song, P., Wen, X., Deng, M., Wang, J., & Guo, X. (2017). Chiral separation of 12 pairs of enantiomers by capillary electrophoresis using heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin as the chiral selector and the elucidation of the chiral recognition mechanism by computational methods. *Journal of Separation Science*, 40(14), 2999–3007.
- Zhang, Y., Wu, D., Wang-Iverson, D., & Tymiak, A. (2005). Enantioselective chromatography in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 10(8), 571–577.
- Zhou, T., Zeng, J., Liu, S., Zhao, T., Wu, J., Lai, W. (2015). Study on the determination and chiral inversion of R-salbutamol in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1002, 218–227.