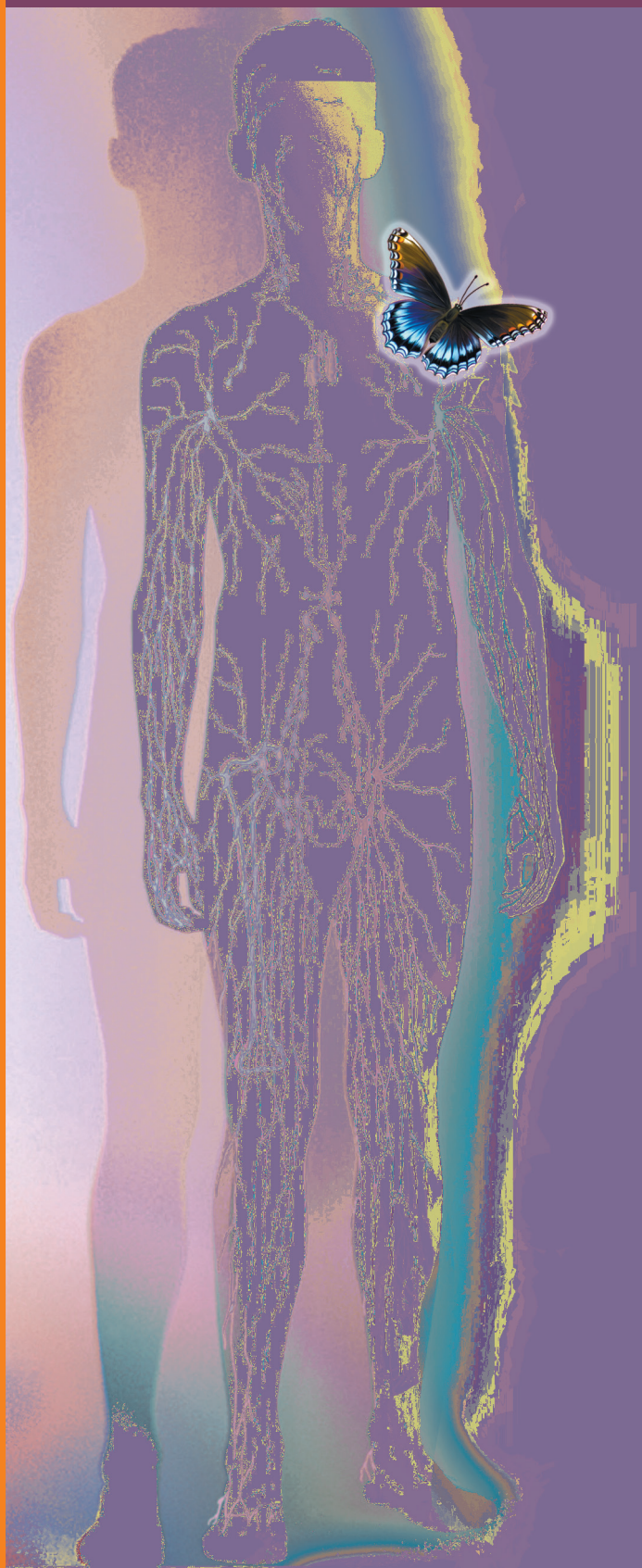
ISSN 2587–7836 (print)
ISSN 2686–8830 (online)

ФАРМАКОКИНЕТИКА и ДИНАМИКА



№ 2.2021

www.PharmacoKinetica.ru

КЛИНИЧЕСКИ ДОКАЗАНО, ЧТО АММИАК МОЖЕТ БЫТЬ ПОВЫШЕН НА ДОЦИРРОТИЧЕСКИХ СТАДИЯХ[1]

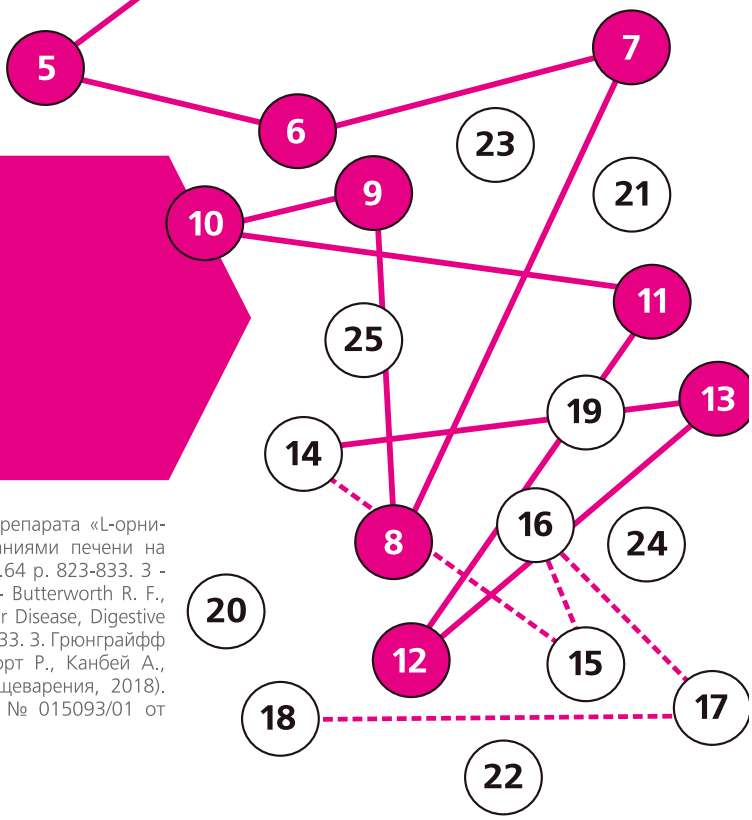
АММИАК МОЖЕТ НЕГАТИВНО ВЛИЯТЬ НА КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ И СТИМУЛИРОВАТЬ РАЗВИТИЕ ФИБРОЗА[2]

Гепа-Мерц®

УМНЫЙ ПОМОЩНИК ДЛЯ ПЕЧЕНИ

1. СПОСОБСТВУЕТ **ОЧИЩЕНИЮ** ОТ ТОКСИНОВ (АММИАКА)
2. СПОСОБСТВУЕТ **НОРМАЛИЗАЦИИ** «ПЕЧЕНОЧНЫХ» ПРОБ (АЛТ, АСТ, ГГТП)[3]
3. МОЖЕТ ПОМОЧЬ **СНИЗИТЬ** ВЫРАЖЕННОСТЬ АСТЕНИЧЕСКОГО СИНДРОМА
4. СПОСОБСТВУЕТ **УЛУЧШЕНИЮ** ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Обладает гепатопротекторными свойствами у пациентов с жировой болезнью печени[4]



Для диагностики пациентов используйте Тест связи чисел на сайте www.ТЕСТПЕЧЕНИ.РФ

1 - Е. А. Агеева, С. А. Алексеенко «Опыт применения пероральной формы препарата «L-орнитин-L-аспартат» при гипераммониемии у больных с хроническими заболеваниями печени на доцирротической стадии». 2 - R. Jalan, F. De Chiara et al. J. Hepatology 2016 vol.64 p. 823-833. 3 - Grungreiff K., Lambert-Baumann J., Die Medizinische Welt, 2001; 52: 219-226, 4 - Butterworth R. F., Canbay A., Hepatoprotection by L-Ornithine L-Aspartate in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Digestive Disease, 2018 (2 - Р. Джалан, Ф. Де Киара и др. Гепатология 2016 изд. 64, с. 823-833. 3. Грюнграйфф К., Ламберт-Бауманн Й., Медицинский Мир, 2001; 52: 219-226, 4. Баттерворт Р., Канбей А., Гепатопротекция L-Орнитином L-аспартатом в НАЖБП, Болезни органов пищеварения, 2018). ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ. НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ. РУ в РФ: П № 015093/01 от 22.03.2007

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№2
2021

Издательство ОКИ

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

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

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

Редакционная коллегия

Бондарева Ирина Борисовна
д. б. н., Москва

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Сычёв Дмитрий Алексеевич
член-корр. РАН, д. м. н., профессор, Москва

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

Шевченко Роман Владимирович
к. м. н., Москва

Выпускающая группа

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

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

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

Подписано в печать 20.02.2021 г. **Тираж** 400 экз.
Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com
115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Тел./Факс: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Оформить подписку можно через «Агентство «Книга-Сервис» или каталог «Пресса России» — подписной **индекс Е45072**

Сайт журнала: www.PharmacoKinetica.ru Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) 04.02.2021 года свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-80349. Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

Сайты	Журналы
www. Antibiotics-Chemotherapy.ru	Антибиотики и Химиотерапия
www. ClinVest.ru	Качественная клиническая практика
www.Hospital-Apteka.ru	Дайджест «Больничная аптека»
www. PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru	Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

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

СОДЕРЖАНИЕ

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В БИОМАТЕРИАЛЕ

Определение потенциального противосудорожного средства ГИЖ-290 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием
Бочков П. О., Хрустова И. П., Литвин А. А., Колыванов Г. Б., Шевченко Р. В., Жердев В. П 3

Подход к количественному определению эндогенных веществ в биожидкостях хроматографическим методом с использованием математического аппарата
Смирнов В. В., Красных Л. М., Раменская Г. В., Казанбеков С. Б. 11

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Антиаритмические свойства монохлоргидрата N-дезацетиллаппаконитина
Крыжановский С. А., Юнусов М. С., Цорин И. Б., Барчуков В. В., Барчукова Е. И. 19

Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функциональную активность транспортёра гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере крыс в норме и при гипоксической гипоксии
Мыльников П. Ю., Щулькин А. В., Черных И. В., Якушева Е. Н. 25

ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Абсолютная биодоступность соединения, обладающего кардиопротективной активностью (АЛМ-802), у крыс
Колыванов Г. Б., Бочков П. О., Литвин А. А., Шевченко Р. В., Подолько А. Л., Жердев В. П. 31

Фармакокинетика и нейротропные эффекты цикло-*L*-пролилглицина и его модифицированных аналогов
Бойко С. С., Жердев В. П., Колясникова К. Н. 36

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Сравнительный хемореактомный анализ орнитина аспартата, S-адеметионина и урсодезоксихолевой кислоты
Торшин И. Ю., Громова О. А. 42

СОДЕРЖАНИЕ

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№2
2021

Издательство
ОКИ

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

Deputy chief editor
Smirnov Valery
Ph.D., Moscow

Executive secretary
Litvin Alexander
Ph.D., Moscow

Editorial Board

Bondareva Irina
Ph.D., Moscow

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

Gromova Olga
Ph.D., Professor, Ivanovo

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

Kovalev Georgy
Ph.D., Professor, Moscow

Colic Larisa
Ph.D., Professor, Moscow

Kolyvanov Gennady
Ph.D., Moscow

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

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

Ramenskaya Galina
Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek
Ph.D., Professor, Moscow

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

Starodubtcev Alex
Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry
Corresponding Member RAS, Ph.D., Professor, Moscow

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

Shevchenko Roman
Ph.D., Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry
Responsible for this issue
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

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

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

Signed in print 20.02.2021 г. **Circulation** 400 copies.
Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com
115093, Moscow, Partiynyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiiskay, 8
FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»
Tel./Fax: + 7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

You can subscribe via the «Agency «Book-Service» or the catalog «Press of Russia» — **Index E45072**

Website: www.PharmacoKinetica.ru The journal was registered with the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) on 02/04/2021, the certificate of registration of the mass media PI No. FS 77-80349. Copyring material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites	Journals
www. Antibiotics-Chemotherapy.ru	Antibiotics and Chemotherapy
www. ClinVest.ru	Good Clinical Practice
www.Hospital-Apteka.ru	Digest «Hospital pharmacy»
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru	Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

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

CONTENTS

METHODS OF DRUG ANALYSIS

Determination of a novel anticonvulsant drug GIZh-290 in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry
Bochkov PO, Khrustova IP, Litvin AA, Kolyvanov GB, Shevchenko RV, Zherdev VP 3

An approach to the quantitative determination of endogenous substances in biological fluids by a chromatographic method using a mathematical apparatus
Smirnov VV, Krasnykh LM, Ramenskaya GV, Kazanbekov SB 11

PRECLICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Antiarrhythmic properties of N-Deacetylappaconitine Hydrochloride
Kryzhanovskii SA, Yunusov MS, Tsorin IB, Barchukov VV, Barchukova EI 19

Effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate on the functional activity of the transporter P-glycoprotein in the blood-brain barrier of rats under normal conditions and under hypoxic hypoxia
Mylnikov PYu, Shchulkin AV, Chernykh IV, Yakusheva EN 25

PHARMACOKINETICS STUDIES

Absolute bioavailability of a substance with cardioprotective activity (ALM-802) in rats
Kolyvanov GB, Bochkov PO, Litvin AA, Shevchenko RV, Podolko AL, Zherdev VP 31

Pharmacokinetics and neurotropic effects of cyclo-*L*-prolylglycine and its modified analogues
Boyko SS, Zherdev VP, Kolyasnikova KN 36

THERAPEUTIC DRUG MONITORING MODE OF ACTION

Comparative chemoreactomic analysis of ornithine aspartate, S-ademethionine and ursodeoxycholic acid
Torshin IYu, Gromova OA 42

CONTENTS

Определение потенциального противосудорожного средства ГИЖ-290 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Бочков П. О., Хрустова И. П., Литвин А. А., Колыванов Г. Б., Шевченко Р. В., Жердев В. П.

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

Аннотация. ГИЖ-290 – новое производное 4-фенилпирролидона, синтезированное на основе рацетамов, сочетающих противосудорожное и ноотропное действие. ГИЖ-290 обладает широким спектром противосудорожных и ноотропных эффектов. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием разработана и валидирована методика количественного определения нового потенциального противосудорожного средства соединения ГИЖ-290 в плазме крови крыс. Для извлечения аналита использовали жидкость-жидкостную экстракцию диэтиловым эфиром. Валидацию методики проводили определением таких её параметров, как селективность, линейность, правильность, прецизионность и стабильность. Линейность методики подтверждена высоким коэффициентом корреляции равным 0,999. Процент извлечения ГИЖ-290 из плазмы крови в среднем составил 79,2 %. Правильность в течение рабочего цикла и между циклами была ≤19,32 %, прецизионность ≤12,14 %. Установлено, что образцы плазмы крови, содержащие ГИЖ-290, можно хранить при комнатной температуре в течение рабочего дня.

Ключевые слова: противосудорожное действие; ГИЖ-290; количественное определение; высокоэффективная жидкостная хроматография; плазма крови

Для цитирования:
Бочков П. О., Хрустова И. П., Литвин А. А., Колыванов Г. Б., Шевченко Р. В., Жердев В. П. Определение потенциального противосудорожного средства ГИЖ-290 в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2021;(2):3–10. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-3-10
Поступила: 18 июля 2021 г. **Принята:** 13 августа 2021 г. **Опубликована:** 10 ноября 2021 г.

Determination of a novel anticonvulsant drug GIZh-290 in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Bochkov PO, Khrustova IP, Litvin AA, Kolyvanov GB, Shevchenko RV, Zherdev VP

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. GIZh-290 is a new derivative of 4-phenylpyrrolidone, based on the structures of racetams that combine anticonvulsant and nootropic effects. The method of high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection was developed and validated for the quantitative determination of a new potential anticonvulsant compound GIZh-290 in rat blood plasma. For the extraction of the analyte, liquid-liquid extraction with diethyl ether was used. The method was validated based on its selectivity, linearity, accuracy, precision, and stability. The linearity of the method was confirmed by a high correlation coefficient of 0.999. The percent recovery of GIZh-290 from blood plasma was 79.2 %. The intra- and inter-batch accuracy were 19.32 and 12.14 %. It was found that blood plasma samples containing GIZh-290 can be stored at ambient temperature during the working day.

Keywords: anticonvulsant effect; GIZh-290; Method validation; Pharmacokinetics; LC–MS/MS; Rat plasma

For citations:
Bochkov PO, Khrustova IP, Litvin AA, Kolyvanov GB, Shevchenko RV, Zherdev VP. Determination of a novel anticonvulsant drug GIZh-290 in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2021;(2):3–10. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-3-10
Received: July 18, 2021. **Accepted:** August 13, 2021. **Published:** November 10, 2021

Введение / Introduction

ГИЖ-290 – новое производное 4-фенилпирролидона, синтезированное в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», на основе структур рацетамов, сочетающих противосудорожное и ноотропное действие. ГИЖ-290 обладает широким спектром противосудорожных эффектов: устраняет генерализованные судороги в тесте антагонизма с максимальным электрошоком и судороги, вызванные пилокарпином, увеличивая латентный период наступления судорог и процент выживших животных [1, 2], а также устраняет электроэнцефалограмму проявления судорожной активности в тесте бемегридовых судорог и в модели хронической фокальной кобальт-индуцированной эпилепсии [2].

Исследование ноотропного эффекта показало, что по влиянию на процессы обучения и воспроизведения ГИЖ-290 в эквивалентных дозах превосходит пирацетам в 160 раз [1, 3].

Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) предоставляет уникальные возможности в доклинических, биофармацевтических и клинических исследованиях [4–6]. Этот метод применим к разнообразным фармакологическим средствам, относящимся к различным химическим классам, и позволяет определять их в биологических средах с высокой селективностью, чувствительностью, скоростью анализа [7]. Режим множественных молекулярных реакций (MRM) обеспечивает детектирование определённого дочернего иона, заранее выбранного оператором. Дочерний ион

получают в результате фрагментации предварительно ионизированной исходной/родительской молекулы. В качестве источника ионизации, как правило, используется электроспрей. Для каждого соединения совокупность родительского и дочернего иона является уникальной, что обуславливает высокую селективность методики количественного определения с использованием масс-спектрометрического детектора [8].

Цель исследования – разработка ВЭЖХ-МС методики определения ГИЖ-290 в плазме крови крыс после простой жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ).

Методику валидировали по следующим параметрам: селективность, чувствительность, правильность, прецизионность, воспроизводимость и стабильность. Это первая методика количественного определения ГИЖ-290 в биожидкости, которая может быть применена для доклинических фармакокинетических исследований.

Материалы и методы / Materials and methods

В работе использовали фармацевтическую субстанцию ГИЖ-290 (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, Россия), серия 300920. ГИЖ-290 – 2,6-диметиланилид (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты.

Органические растворители имели квалификацию «для хроматографии»: этилацетат («Merck», ФРГ), метанол («Acros Organics», Россия), ацетонитрил («J.T. Baker», США), диэтиловый эфир («Acros Organics», Россия). Все другие реактивы и растворители имели квалификацию «ч.д.а.».

Калибровочные стандарты и образцы контроля качества / Calibration Standards and Quality control samples

Матричный раствор ГИЖ-290 (1 мг/мл) готовили на метаноле. Рабочие стандартные растворы требуемой концентрации для построения калибровочных кривых и образцов контроля качества (КК) готовили путём серийных разведений в смеси метанол:вода (50:50, об/об). Все растворы до их использования хранили при –24 °С.

Растворы для построения калибровочных кривых ГИЖ-290 готовили внесением рабочего стандартного раствора, эквивалентного 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 и 1000 нг/мл исследуемого вещества, в интактную плазму крови крыс. Образцы КК также готовили на плазме крови (10, 50, 250, 750 нг/мл).

В настоящей методике биоматрицей для приготовления стандартных растворов служила плазма крови крыс с массой тела 180–220 г, полученных из питомника «Филиал «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская обл.). Образцы крови получали методом декапитации интактных животных. Плазму крови получали центрифугированием образцов цельной крови при 3500 об/мин в течение 10 мин. Образцы плазмы крови крыс хранили при –50 °С.

Приборы и условия хроматографирования / Equipment and chromatography conditions

Исследование выполнено с использованием совмещённой системы высокоэффективного жидкостного хроматографа «Agilent 1200» («Agilent», США), с масс-селективным детектором типа «ионная ловушка» модели «Agilent 6310 Series LC/MSD Ion Trap» («Agilent», США). Система состоит из дегазатора подвижной фазы, бинарного насоса, автосемплера, термостата хроматографических колонок. Ионизацию молекул соединения ГИЖ-290 проводили в режиме положительной ионизации молекул на электроспрее при атмосферном давлении. Управление системой ВЭЖХ-МС осуществлялось компьютером с системой обработки данных «ChemStation» (v.1.0).

В работе использовали хроматографическую колонку «Agilent Zorbax Eclipse XDB-CN» (150×2,1 мм; зернение 5 мкм) с предколонкой «Zorbax Eclipse XDB-CN» (12,5×2,1 мм; зернение 5 мкм). Температура термостата хроматографической колонки составляла 40 °С.

Хроматографирование проводили в изократическом режиме в подвижной фазе, состоящей из раствора «А» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили до общего объёма 1 л водой деионизованной) и раствора «Б» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили до общего объёма 1 л ацетонитрилом). Воду деионизованную получали на установке «Водолей-М» (НПО «Химэлектроника», Россия). Соотношение компонентов «А»:«Б» – 70:30. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,35 мл/мин. В инжектор хроматографа вводили 10 мкл анализируемой смеси.

Пробоподготовка / Sample preparation

Образцы плазмы крови, хранящиеся в морозильной камере при –50 °С, размораживали при комнатной температуре. 0,1 мл плазмы крови переносили в экстракционную пробирку, прибавляли 2,0 мл диэтилового эфира и помещали на горизонтальный встряхиватель на 10 мин. Далее органический слой переносили в другую пробирку и упаривали досуха в токе азота при 40 °С на водяной бане. Сухой остаток растворяли в 0,1 мл подвижной фазы. Для анализа использовали 10 мкл надосадочной жидкости.

Валидация / Validation

Аналитическую методику определения ГИЖ-290 валидировали по следующим показателям: селективность, линейность, правильность и прецизионность. Для оценки влияния мешающих определению веществ и селективности анализировали экстракт, полученный от 6 различных животных. Калибровочные кривые строили методом линейной регрессии, откладывая по оси ординат (y) площадь хроматографического пика ГИЖ-290 к его концентрации (ось абсцисс – x) в нг/мл. Нижний предел детектирования рассчитывали как 3-кратное отношение «сигнал–шум». Нижний предел

количественного определения (НПКО) оценивали как наименьшую концентрацию, которую можно было обсчитать с приемлемой прецизионностью (не выше 20 %).

Прецизионность и правильность методики оценивали, анализируя образцы (25, 50, 500 и 750 нг/мл) в течение 1 и 3 дней, соответственно.

Процент отклонения среднего от рассчитанных концентраций выражали в виде относительной ошибки RE. Прецизионность выражали в виде относительного стандартного отклонения (RSD). Критерии приемлемости оценивали в соответствии с требованиями ЕАЭС, EMA и FDA [9–12].

Эффект матрицы и процент извлечения / Matrix effect and recovery

Для определения эффекта матрицы образцы, подвергшиеся процедуре пробоподготовки, сравнивали с рабочими стандартными растворами в тех же концентрациях. Процент извлечения определяли сравнением площадей пиков исследуемого вещества, внесённого до экстракции с рабочими стандартными растворами ГИЖ-290. Каждый образец анализировали по 6 раз.

Стабильность / Stability

Исследование стабильности ГИЖ-290 в плазме крови крыс проводили, анализируя три концентрации КК (50, 250 и 750 нг/мл). Краткосрочная стабильность включала: а) стабильность в течение 3 циклов «заморозка–разморозка»; б) выдерживание образцов при комнатной температуре в течение рабочего дня и в) выдерживание образцов после пробоподготовки при комнатной температуре в подвижной фазе в течение рабочего дня. Долговременную стабильность оценивали выдерживанием образцов при –50 °С в течение 30 суток.

Результаты и обсуждение / Results of the study

Детектирование в MRM-режиме обеспечивает очень специфичный и чувствительный отклик на исследуемое вещество. Для ГИЖ-290 отмечается масс-спектрометрический отклик как в положительном, так и отрицательном режимах ионизации. Однако интенсивность сигнала в положительном режиме значительно выше по сравнению с отрицательным. ГИЖ-290 соответствовал родительский молекулярный ион $[M+H]^+$ равный 323. Для количественного определения аналита использовали MRM-режим, обеспечивающий лучшую селективность и чувствительность.

Для подтверждения правильной идентификации и во избежание ложноположительных результатов было выбрано два различных дочерних иона, и отношение площадей пиков этих ионов (количественного и подтверждающего) сравнивали с площадями стандартного образца ГИЖ-290.

На рис. 1 представлена структура и продукты фрагментации ГИЖ-290, а также типичный масс-спектр родительского и дочерних молекулярных ионов. В качестве основного молекулярного иона для количественного анализа использовали ион с m/z 174 и в качестве подтверждающего – m/z 202.

Хроматографическое разделение проводили на колонке «Agilent Zorbax Eclipse XDB-CN», обеспечивающую отличную форму пика, эффективность разделения, приемлемую линейность и воспроизводимость на фоне эндогенных соединений. Оптимизацию состава подвижной фазы проводили исходя из селективности пика аналита и его времени удерживания.

Снижение доли органического растворителя привело к сужению пика ГИЖ-290 и уменьшению времени удерживания. В описанных ранее условиях время

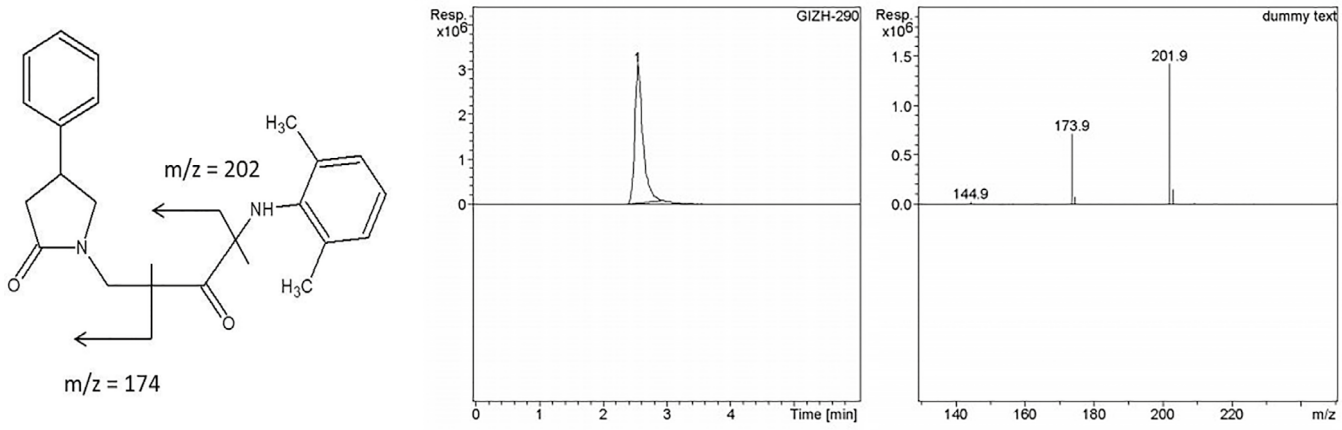


Рис. 1. Структура и фрагментация молекулы ГИЖ-290
Figure 1. Structure and fragmentation of GIZh-290 molecule

удерживания аналита составило 2,6 мин. На рис. 2 представлены хроматограммы интактной плазмы крови и плазмы крови крысы, содержащей 10 нг/мл (НПКО) ГИЖ-290.

Пробоподготовка / Sample preparation

В качестве метода извлечения исследуемого вещества из биоматрицы использовали ЖЖЭ. Выбор метода основывался на его эффективности, специфичности и низкой стоимости по сравнению с твёрдофазной экстракцией. В качестве экстрагентов использовали этилацетат, метиленхлорид и диэтиловый эфир. Этилацетат и метиленхлорид продемонстрировали относительно низкую экстракционную эффективность (процент экстракции 60 и 45 %, соответственно). Диэтиловый эфир проявил себя как наиболее эффективный экстрагент для извлечения ГИЖ-290 (процент экстракции 79 %).

Несмотря на то что полярный растворитель способен экстрагировать полярные примеси, это никак не повлияло на стабильность базовой линии. На экстракцию одной пробы требовалось не более 20 мин и 2 мл диэтилового эфира из 0,1 мл плазмы крови.

Валидация и эффект матрицы / Validation and matrix effect

Типичные MRM-хроматограммы интактной плазмы крови и НПКО образца представлены на рис. 2. Из рис. 2 видно, что эндогенные вещества не влияли на время удерживания ГИЖ-290.

Калибровочные кривые ГИЖ-290 получали линейным регрессионным анализом наименьших квадратов в диапазоне 10–1000 нг/мл. Для количественного анализа использовали взвешенную регрессию (1/x). Коэффициенты корреляции (r) для стандартных кривых из различных источников плазмы крови равнялись 0,999, демонстрируя отличную линейность.

Воспроизводимость внутри одного рабочего цикла и между несколькими рабочими циклами оценивалась, исходя из правильности и прецизионности (табл. 1).

Как видно из табл. 1 правильность внутри одного цикла колебалась от 0,15 до 9,83 % (определяли, как

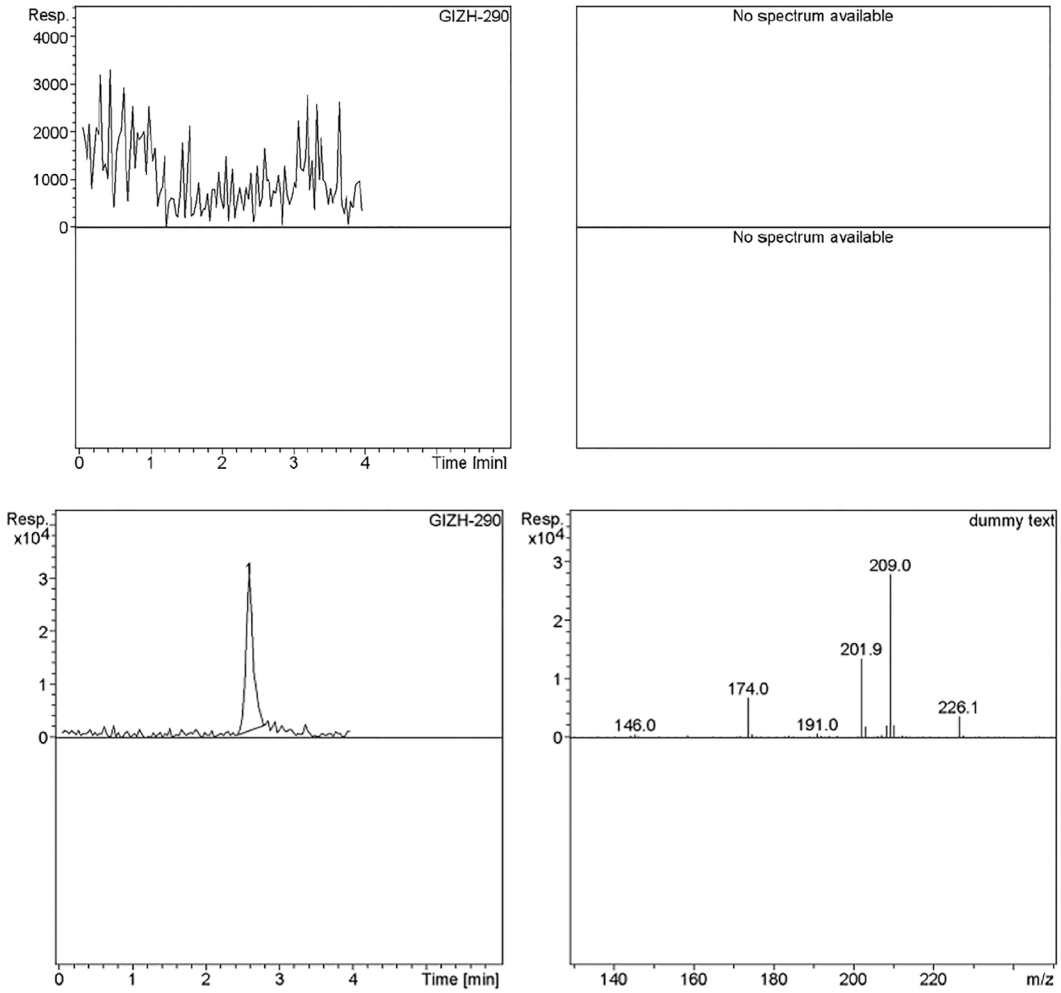


Рис. 2. Хроматограммы и масс-спектр: а) интактной плазмы крови; б) НПКО ГИЖ-290 в плазме крови (10 нг/мл)
Figure 2. Chromatograms and mass-spectrum: a) blank blood plasma; b) LLOQ GIZh-290 in the blood plasma (10 ng/ml)

Таблица 1

Воспроизводимость и правильность ГИЖ-290 в плазме крови крыс (n = 6)

Table 1

Reproducibility and accuracy of GIZh-290 in rat blood plasma (n = 6)

Теоретическая концентрация, нг/мл / Theoretical concentration, ng/ml	Внутри цикла найдено, нг/мл / Intra cycle, Found ng/ml	RSD %	RE %	Между циклами найдено, нг/мл / Inter cycles Found ng/ml	RSD %	RE %
10	9,02	16,83	–9,83	10,31	19,32	12,14
50	49,57	5,01	–0,87	51,13	7,58	2,09
250	248,72	3,70	0,51	249,24	5,11	–1,57
750	758,42	3,41	–0,15	743,28	6,18	–0,41

Примечания: RSD = (SD концентрации/средняя концентрация) ×100 %; RE = (рассчитанная концентрация – теоретическая концентрация)/теоретическая концентрация ×100 %.
Notes: RSD = (SD concentration/mean concentration) ×100 %; RE = (estimated concentration–theoretical concentration)/theoretical concentration ×100 %.

RE) с RSD в диапазоне от 3,41 до 16,83 %. Правильность между рабочими циклами изменялась от 0,41 до 12,41 % с RSD в диапазоне от 5,11 до 19,32 %, демонстрируя приемлемую правильность.

Считается, что эффект матрицы (ЭМ) обусловлен коэлюированием, снижением или усилением интенсивности иона аналита. Средние матричные эффекты ГИЖ-290 в концентрациях 10, 50, 250 и 750 нг/мл составили 95,23; 106,08; 89,37 и 95,26 %, а средний процент экстракции для этих концентраций – 79,85; 78,09; 80,80 и 77,82 %, соответственно (табл. 2).

Чтобы оценить эффективность обработки проб, стандарты, вносимые в плазму крови до экстракции, сравнивали со стандартами, приготовленными на подвижной фазе. Эффективность обработки проб ГИЖ-290 составила 78,31–83,15 %. Чувствительность разработанной методики достаточно высокая, чтобы её можно было использовать в дальнейших фармакокинетических исследованиях.

Стабильность / Stability

Стабильность ГИЖ-290 изучали на образцах КК в различных условиях хранения. Матричный раствор аналита в метаноле был стабилен при –24 °С в течение 30 суток.

В табл. 3 представлены результаты изучения стабильности ГИЖ-290 в плазме крови. Не отмечено значимого отличия между кратковременным и долговременным хранением аналита при –50 °С.

Три цикла «заморозки–разморозки» и постпрепаративная стабильность незначительно повлияли на количественное содержание ГИЖ-290 в образцах. Концентрация ГИЖ-290 при хранении образцов при комнатной температуре в течение рабочего дня практически не снижалась. Стабильность исследуемого

Таблица 2

Процент извлечения, эффект матрицы и эффективность обработки (n = 6)

Table 2

Recovery, matrix effect and process efficiency (n = 6)

Концентрация, нг/мл / Concentration ng/ml	ЭМ, % а) / Matrix effect	Процент извлечения, % б) / Recovery	Эффективность обработки, % в) / Process efficiency
10	95,23	79,85	81,07
50	106,08	78,09	83,15
250	89,37	80,80	79,26
750	95,26	77,82	78,31

Примечания: а) ЭМ оценивали как отношение средней площади пика аналита, добавленного после экстракции, к средней площади пика аналита стандартного образца, умноженного на 100; б) процент экстракции рассчитывали как отношение средней площади пика аналита, добавленного до экстракции, к средней площади пика аналита добавленного после экстракции, умноженного на 100; в) эффективность обработки рассчитывали как отношение средней площади пика аналита, добавленного до экстракции, к средней площади пика стандартного образца аналита, умноженного на 100.
Notes: a) the ME was estimated as the ratio of the average peak area of the analyte added after extraction to the average peak area of the analyte of the standard sample multiplied by 100; b) the extraction percentage was calculated as the ratio of the average peak area of the analyte added before extraction to the average peak area of the analyte added after extraction multiplied by 100; c) the processing efficiency was calculated as the ratio of the average peak area of the analyte added before extraction to the average peak area of the standard analyte sample multiplied by 100.

Таблица 3

Стабильность ГИЖ-290 в плазме крови крыс (n = 6)

Table 3

Stability of GIZh-290 in rat plasma (n = 6)

Условия хранения / Storage conditions	50 нг/мл			250 нг/мл			750 нг/мл		
		RSD, %	RE, %		RSD, %	RE, %		RSD, %	RE, %
Краткосрочное хранение / Short-time storage:									
а a	47,37	6,11	-1,09	238,54	4,26	-3,15	762,23	3,32	3,65
б b	48,12	7,04	-0,91	231,44	5,18	-1,29	737,83	4,02	-0,62
в c	47,89	5,72	-2,32	240,06	3,78	-1,89	722,69	3,44	-0,97
Долговременное хранение / Long-time storage: г d	48,73	5,13	-1,71	237,23	3,68	-2,08	758,62	2,47	1.07

Примечания: а) стабильность в течение 3 циклов «заморозка–разморозка»; б) выдерживание образцов при комнатной температуре в течение рабочего дня; в) выдерживание образцов после пробоподготовки при комнатной температуре в подвижной фазе в течение рабочего дня; г) выдерживание образцов при –50 °С в течение 30 суток.
Notes: a) stability for 3 “freezing-defrost” cycles; b) samples storage at ambient temperature for working day; c) samples storage after preparation at ambient temperature in mobile phase for working day; d) samples storage at –50 °C for 30 days.

вещества в течение рабочего дня колебалась от 98,11 до 99,01 %. Поэтому пробы плазмы крови, содержащие ГИЖ-290, можно хранить в течение рабочего дня при комнатной температуре.

Заключение / Conclusions

Разработана и валидирована чувствительная и селективная ВЭЖХ-МС методика определения нового потенциального противосудорожного средства ГИЖ-290 в плазме крови. Для экстракции аналита использовали ЖЖЭ. Валидацию методики проводили исходя из её селективности, линейности, правильности, прецизионности и стабильности. Линейность методики подтверждена высоким коэффициентом корреляции равным 0,999. Процент извлечения ГИЖ-290 из плазмы крови в среднем составил 79,2 %. Правильность в течение рабочего цикла и между циклами была ≤19,32 % и прецизионность ≤12,14 %. Установлено, что образцы плазмы крови, содержащие ГИЖ-290, можно хранить при комнатной температуре в течение рабочего дня.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бочков Павел Олегович
e-mail: bok-of@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8555-5969
SPIN-код: 5576-8174
к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Bochkov Pavel O.
e-mail: bok-of@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8555-5969
SPIN code: 5576-8174
PhD in Biology, Senior Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Хрустова Ирина Павловна
e-mail: iphrustova@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-0277-3595
SPIN-код: 7304-5377
Лаборант-исследователь лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Khrustova Irina P.
e-mail: iphrustova@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-0277-3595
SPIN code: 7304-5377
Research Laboratory Assistant of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

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

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

Шевченко Роман Владимирович
e-mail: rmn.shev@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4646-7733
SPIN-код: 1844-6202
к. м. н., н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Жердев Владимир Павлович
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2710-7134
SPIN-код: 2213-9592
д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

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

Kolyvanov Gennadiy B.
e-mail: 7822535@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2571-0047
SPIN code: 2538-8639
D. Sci. in Biology, Leading researcher of the laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Shevchenko Roman V.
e-mail: rmn.shev@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4646-7733
SPIN code: 1844-6202
PhD in Medicine, Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Zherdev Vladimir P.
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2710-7134
SPIN code: 2213-9592
D. Sci. in Medicine, professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Жмуренко Л.А., Литвинова С.А., Мокров Г.В., Ковалев И.Г., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Гудашева Т.А. Синтез, противосудорожная и ноотропная активность производных 4-фенилпирролидона. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(5):20–27. [Zhmurenko LA, Litvinova SA, Mokrov GV, Kovalev IG, Voronina TA, Nerobkova LN, Gudasheva TA. Synthesis of 4-phenylpyrrolidone derivatives with anticonvulsant and nootropic activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(5):20–27. (In Russ).]. DOI:10.30906/0023-1134-2019-53-5-20-27.

2. Ковалев И.Г. Поиск соединений с противосудорожной активностью среди новых производных 4-фенилпирролидона и кумарина и изучение их нейрохимических механизмов действия: Дис. ... канд. мед. наук. – М.: 2017. [Kovalev IG. Search for compounds with anticonvulsant activity among new derivatives of 4-phenylpyrrolidone and coumarin and study of their neurochemical mechanisms of action. [dissertation] Moscow: 2017. (In Russ).]. Доступно по: https://www.academpharm.ru/images/upload/ru/1510/Dissertaciya_Kovalev_I.G.pdf.

3. Ковалёв И.Г., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В. Сравнение противосудорожных и мнемотропных свойств новых производных 4-фенилпирролидона, леветирацетама и пирацетама. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017;80(6):13–18. [Kovalev IG, Voronina TA, Litvinova SA, Zhmurenko LA, Mokrov G V. Comparison of anticonvulsant and mnemotropic properties of new derivatives of 4-phenylpyrrolidone, levetiracetam and piracetam. Russian Journal of *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2017;80(6):13–18. (In Russ).]. DOI:10.30906/0869-2092-2017-80-6-13-18.

4. Srinivas NR. Applicability of bioanalysis of multiple analytes in drug discovery and development: review of select case studies including assay development considerations. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(5):383-414. DOI: 10.1002/bmc.594

5. Hopfgartner G, Bourgogne E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2003;22(3):195–214. DOI: 10.1002/mas.10050.

6. Chao Zhang, Lu Wang, Yan Yang, Yantong Sun, Jie Zhang, Guoqing Li, Jingkai Gu. Validated LC–MS/MS method for the determination of sarpogrelate in humanplasma: Application to a pharmacokinetic and bioequivalence study in Chinese volunteers. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;53(3):546–551. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.03.025.

7. Gillespie TA, Winger BE. Mass spectrometry for small molecule pharmaceutical product development: a review. *Mass Spectrom Rev*. 2011;30(3):479–490. DOI: 10.1002/mas.20289.

8. Lee MS, Kerns EH. LC/MS applications in drug. *Mass Spectrom Rev*. 1999;18(3-4):187–279. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2787(1999)18:3/4<187:AID-MAS2>3.0.CO;2-K.

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

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

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

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

Подход к количественному определению эндогенных веществ в биожидкостях хроматографическим методом с использованием математического аппарата

Смирнов В. В.[1, 2], Красных Л. М.[1], Раменская Г. В.[1, 2], Казанбеков С. Б.[2]

[1] – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

[2] – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия

Аннотация. *Актуальность исследования:* Количественное определение эндогенных веществ является важной задачей в экспериментальной и клинической фармакологии. В случае работы с эндогенными соединениями возникают определённые сложности. Главным из них является невозможность получения такой же биоматрицы без эндогенного соединения для использования в качестве эталонных растворов при построении калибровочных кривых. *Цель*: Цель исследования – разработка математической методики расчёта концентрации эндогенных соединений в биообъектах с помощью хроматографических методов, позволяющей получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений. *Материалы и методы*: для реализации вычислительной части предложенного алгоритма используется программа инженерных расчётов Mathcad версии 15.0. *Результаты*: Разработана математическая методика расчёта концентрации эндогенных соединений в биообъектах с помощью хроматографических методов, которая позволяет получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений. Особенностью данной методики является использование исключительно анализируемого биообъекта для проведения количественного определения эндогенных веществ, без использования так называемых «чистых» биообъектов для калибровочных кривых, а также дорогостоящих дейтерированных аналогов маркеров – субстратов изоферментов CYP450 и их метаболитов. Это позволяет сохранить оригинальный биоматричных эффект при снятии хроматограммы. Также используется статистический аппарат для исключения возможных грубых ошибок. Для подтверждения достоверности разработанного метода количественного определения установлена сходимость результатов, полученных данным методом и при использовании дейтерированных стандартов. *Выводы*: Разработана математическая методика расчёта концентрации эндогенных соединений в биообъектах с помощью хроматографических методов, которая позволяет получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений.

Ключевые слова: CYP3A4; метаболическая активность; фенотипирование; кортизол; критерий Колмогорова; критерий Пирсона; критерий Граббса

Для цитирования:
Смирнов В. В., Красных Л. М., Раменская Г. В., Казанбеков С. Б. Подход к количественному определению эндогенных веществ в биожидкостях хроматографическим методом с использованием математического аппарата. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2021;(2):11–18. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-11-18

Поступила: 18 июля 2021 г. **Принята:** 13 августа 2021 г. **Опубликована:** 10 ноября 2021 г.

An approach to the quantitative determination of endogenous substances in biological fluids by a chromatographic method using a mathematical apparatus

Smirnov VV[1, 2], Krasnykh LM[1], Ramenskaya GV[1, 2], Kazanbekov SB[2]

[1] – FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

[2] – FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy Uneversity), Moscow, Russia

Abstract. *Relevance of the study*: The quantification of endogenous substances is an important task in experimental and clinical pharmacology. In the case of working with endogenous compounds, certain difficulties arise. The main one is the impossibility of obtaining the same biomatrix without endogenous compounds for use as standard solutions in the construction of calibration curves. *Purpose*: The aim of our study was to develop a mathematical methodology for calculating the concentration of endogenous compounds in biological objects measured by chromatography, which allows us to obtain a statistically reliable interval estimation of the concentration of endogenous compounds. *Materials and methods*: To implement the computational part of the proposed algorithm, the Mathcad engineering calculation program version 15.0 from PTC (Parametric Technology Corporation) is used, which operates under the family of Windows operating systems (XP, 7, Vista, 8). *Main results*: A mathematical methodology has been developed for calculating the concentration of endogenous compounds in biological objects measured by chromatography, which allows one to obtain a statistically reliable interval estimate of the concentration of endogenous compounds. A feature of this technique is the use of an exclusively analyzed bioobject for quantitative determination of endogenous substances, without the use of so-called "pure" bioobjects for calibration curves, as well as expensive deuterated analogs of markers – substrates of CYP450 isoenzymes and their metabolites. This allows you to maintain the original biomatrix effect when removing the chromatogram. A statistical apparatus is also used to eliminate possible gross errors. To confirm the reliability of the developed method of quantitative determination, the convergence of the results obtained by this method using deuterated standards is established. *Conclusions*: A mathematical methodology has been developed for calculating the concentration of endogenous compounds in biological objects measured by chromatography, which allows one to obtain a statistically reliable interval estimate of the concentration of endogenous compounds. A feature of this technique is the use of only the analyzed bioobject for quantitative determination of endogenous substances, which allows you to maintain the original biomatrix effect when removing the chromatogram.

Keywords: CYP3A4; metabolic activity; phenotyping; cortisol; Kolmogorov criterion; Pearson test; Grubbs test

For citations:
Smirnov VV, Krasnykh LM, Ramenskaya GV, Kazanbekov SB. An approach to the quantitative determination of endogenous substances in biological fluids by a chromatographic method using a mathematical apparatus. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2021;(2):11–18. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-11-18

Received: July 18, 2021. **Accepted:** August 13, 2021. **Published:** November 10, 2021

Введение / Introduction

Количественное определение эндогенных веществ является актуальной задачей в диагностике заболеваний, определении метаболической активности, определении маркеров патологических состояний. В данной работе количественное определение наиболее актуально для определения активности изофермента цитохрома Р450 методом фенотипирования с использованием эндогенных субстратов, таких как кортизол, пинолин, холестерин и др.

Для количественного определения с помощью инструментального физико-химического хроматографического метода преимущественно используется два подхода к обработке данных, а именно: метод абсолютной градуировки (калибровки) и метод внутреннего стандарта. Причём и тот, и другой метод практически предполагает построение калибровочной кривой, эталонные растворы которых необходимо хроматографировать в строго идентичных условиях, что и анализируемый образец. К таким условиям относятся: температура, давление, параметры прибора и колонки, подвижная и неподвижная фазы, растворитель, методика пробоподготовки и прочее.

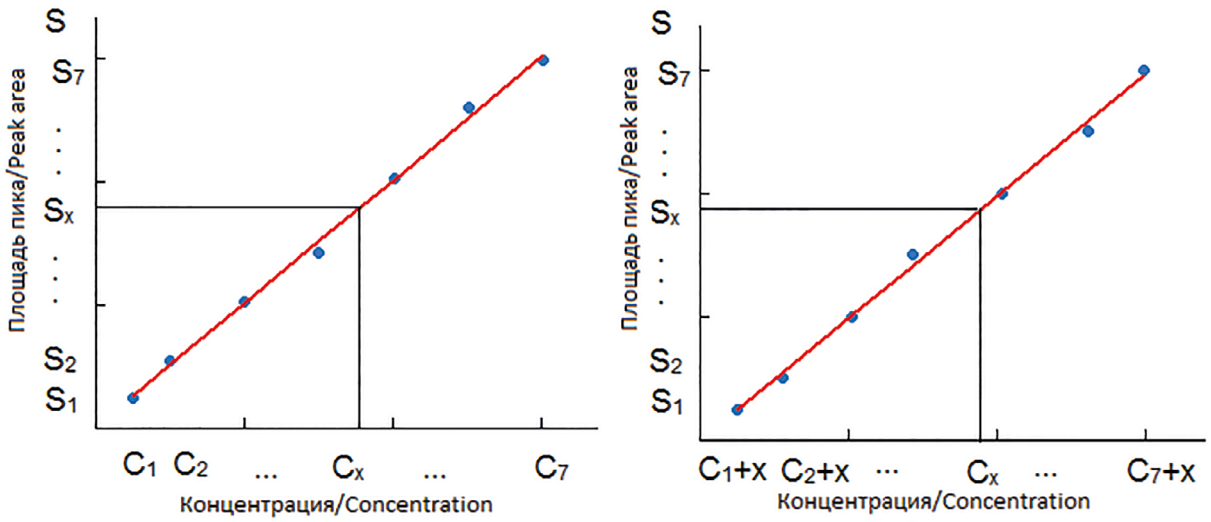
Сложность определения концентрации эндогенного соединения в биообъекте с использованием хроматографического метода заключается в невозможности получения такой же биоматрицы без эндогенного соединения для использования в качестве эталонных растворов при построении калибровочных кривых (рис. 1).

Для решения данных вопросов необходимо разработать соответствующую методику. В связи с этим, целью данного исследования была разработка математической методики расчёта концентрации эндогенных соединений в биообъектах, измеренных методом хроматографии, позволяющую получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений.

Количественное определение эндогенных веществ является важной задачей в экспериментальной и клинической фармакологии, что подтверждается большим количеством работ в данном направлении, например [1, 2].

При количественном определении методом хроматографии в фармакологии используется два подхода к обработке данных: метод абсолютной градуировки (калибровки) и метод внутреннего стандарта. Оба метода предполагают построение калибровочной кривой, эталонные растворы которых необходимо хроматографировать в одинаковых условиях с анализируемым образцом.

В случае работы с экзогенными соединениями, как правило, сначала разрабатывается методика количественного определения вещества в водном или спиртовом растворе (но не в биожидкости). Далее разрабатывается методика количественного определения экзогенного вещества непосредственно в биожидкости, например, в плазме крови, на так называемой «чистой» плазме. Такая методика состоит из двух частей. Во-первых, разрабатывается методика пробоподготовки, основной целью которой является



а *б*

Рис. 1. Калибровочная кривая для экзо- (*а*) и эндогенного (*б*) вещества
Figure 1. Calibration curve for exo- (*a*) and endogenous (*b*) substances

получение максимального количества определяемого вещества в подходящем растворителе, то есть подбираются операции и материалы для достижения оптимального процента экстракции вещества, который в надлежащих практиках, как правило, составляет 70–80 % и более. Во-вторых, разрабатывается методика хроматографирования, целью которой является непосредственное количественное определение: выбор метода обработки результатов, выбор внутреннего стандарта (если используется метод внутреннего стандарта), выбор рабочих растворов и калибровочных стандартов, подбор параметров хроматографирования и прочее.

В случае работы с эндогенными соединениями возникают определённые сложности. Кроме указанных ранее, следует отметить, что отсутствует «чистая» плазма, то есть такая же плазма без соединения. Эту проблему в основном решают получением «чистых» или модельных биожидкостей путём разного рода очисток, в процессе которых происходит очистка не только от интересуемого эндогенного соединения, но и от других веществ, влияющих на общий уровень базовой линии при хроматографировании, на неидентичность условий пробоподготовки модельных и анализируемых образцов.

Материалы и методы / Materials and methods

Средства ПО / Software

Для реализации вычислительной части предложенного алгоритма используется программа инженерных расчётов Mathcad версии 15.0 от корпорации PTC (Parametric Technology Corporation), которая функционирует под управлением семейства операционных систем Windows (XP, 7, Vista, 8). Главными достоинствами Mathcad и его колоссальным преимуществом перед другими расчётными средствами являются лёгкость и наглядность программирования задачи, отображение сложных математических выражений в том виде, в каком они обычно записываются на листе бумаги, то есть отсутствие специального языка программирования, простота использования, возможность создания средствами Mathcad высококачественных технических отчётов с таблицами, графиками и текстом.

В данной работе разработана математическая методика количественного определения эндогенных веществ хроматографическим методом (рис. 2).

Пробоподготовка и хроматографирование / Sample preparation and chromatography

Методика пробоподготовки и хроматографирования соответствует методике Смирнова В.В. [3].

Рассмотрим различные блоки предлагаемого алгоритма более подробно.

Генерация выборочной совокупности концентраций / Generation of a concentrations sample set

После хроматографирования двух совокупностей проб – серии стандартных разведений в органическом растворителе и серии стандартных концентраций в нативной плазме, экстрагируемых впоследствии в органический растворитель – имеем данные, представленные в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Измерения серии стандартных разведений

Table 1

Measurements of a series of standard dilutions

Известные концентрации из серии стандартных разведений в органическом растворителе C	Площадь пиков на хроматограмме S'
C'_1	S'_1
C'_2	S'_2
...	...
C'_i	S'_i
...	...
C'_m	S'_m

Таблица 2

Измерения серии стандартных концентраций в нативной плазме

Table 2

Measurements of a series of standard concentrations in native plasma

Неизвестные концентрации в нативной плазме вещества А, извлечённого в органический растворитель C	Площадь пиков на хроматограмме S
$(x + C_0)z_0$	S_0
$(x + C_1)z_1$	S_1
$(x + C_2)z_2$	S_2
...	...
$(x + C_i)z_i$	S_i
...	...
$(x + C_n)z_n$	S_n

В табл. 1 и 2 концентрации C'_i и C_i (при $m = n$) могут быть одинаковыми, а концентрация C_0, как правило, равна нулю.

Найдем среднее значение неизвестной концентрации $\bar{x}$ вещества А в нативной плазме и среднее значение % экстракции $\bar{z}$.

Предположим $z_0 = z_1 = ... = z_i = ... = z_n = z$, тогда для 0-го и 1-го измерения:

$$\frac{(x+C_0)z_0}{(x+C_1)z_1} = \frac{S_0}{S_1} \Rightarrow \frac{(x+C_0)z}{(x+C_1)z} =$$

$$= \frac{S_0}{S_1} \Rightarrow (x+C_0)S_1 = (x+C_1)S_0 \Rightarrow$$

$$x(S_1 - S_0) = C_1S_0 - C_0S_1 \Rightarrow x = \frac{C_1S_0 - C_0S_1}{S_1 - S_0}.$$

Обозначим $x = x_{01}$.

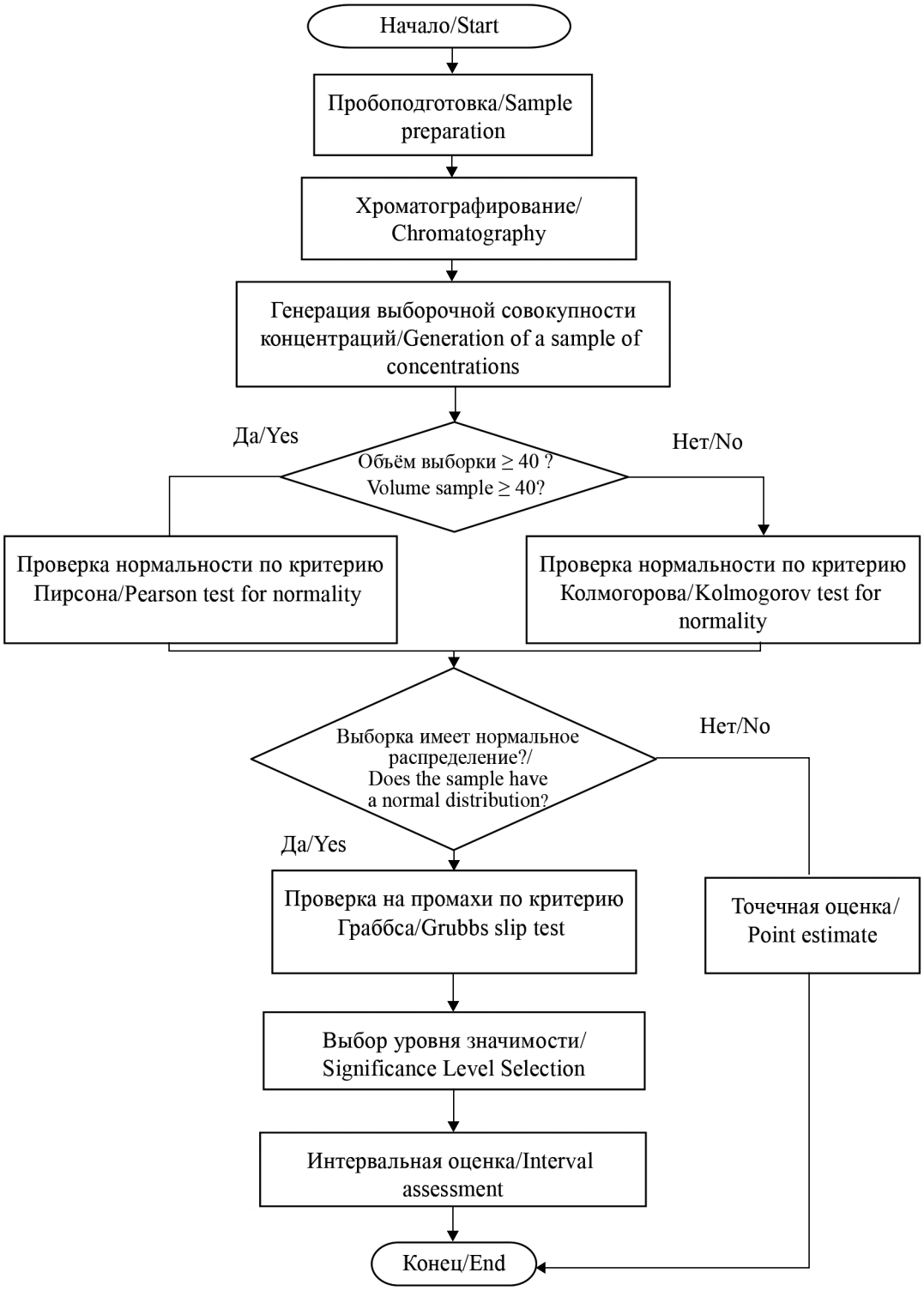


Рис. 2. Алгоритм количественного определения эндогенных веществ в биообъектах хроматографическим методом
Figure 2. Algorithm for quantitative determination of endogenous substances in biological objects by chromatographic method

Для i-го и $(i+1)$-го измерения

$$\frac{(x+C_i)z_i}{(x+C_{i+1})z_{i+1}} = \frac{S_i}{S_{i+1}} \Rightarrow x = x_{i,i+1} = \frac{C_{i+1}S_i - C_iS_{i+1}}{S_{i+1} - S_i}.$$

Вообще, для

$$\forall i, j : i \in \{0,...,n-1\}, j \in \{1,...,n\}, i < j \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \frac{(x+C_i)z_i}{(x+C_j)z_j} = \frac{S_i}{S_j} \Rightarrow x_{ij} = \frac{C_jS_i - C_iS_j}{S_j - S_i}.$$

Условие $i<j$ ограничивает дублирование данных, поскольку $x_{ij} = x_{ji}$.

Вычисленные значения неизвестных концентраций можно представить в виде матрицы $(n+1)\times(n+1)$:

$$\left\|x_{ij}\right\|_{(n+1)\times(n+1)} = \begin{Vmatrix} 0 & x_{01} & x_{02} & \cdots & x_{0n} \\ 0 & 0 & x_{12} & \cdots & x_{1n} \\ & & \ddots & \ddots & \vdots \\ & 0 & & \ddots & x_{n-1n} \\ & & & & 0 \end{Vmatrix}.$$

Всего количество значащих x_{ij} равно $N = \sum_{k=1}^{n} k = \frac{n(n+1)}{2}$, т. е. имеется выборка случайной величины ξ_x объёмом $N = \frac{n(n+1)}{2}$ (рис. 3).

На основе этой матрицы неизвестных концентраций получаем выборочное среднее значение по выборке:

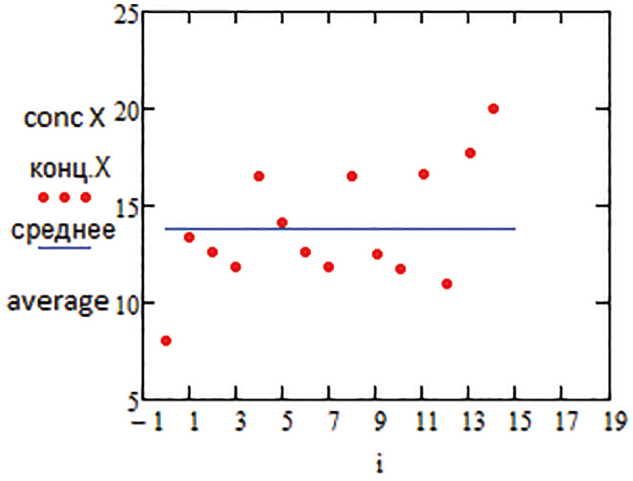


Рис. 3. Пример генеральной совокупности неизвестных концентраций
Figure 3. An example of a population of unknown concentrations

$$\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_i \sum_{\substack{j \\ i<j}} x_{ij} = \frac{2}{n(n+1)}\sum_i \sum_{\substack{j \\ i<j}} x_{ij}.$$

Также получаем выборочное среднее квадратичное отклонение (СКО) по выборке:

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{N-1}\sum_i \sum_{\substack{j \\ i<j}} (x_{ij} - \bar{x})^2} = \sqrt{\frac{2}{n(n+1)-2}\sum_i \sum_{\substack{j \\ i<j}} (x_{ij} - \bar{x})^2}.$$

Теперь, зная значение $\bar{x}$, можно найти среднее значение % экстракции $\bar{z}$. Для этого используем соотношения с известными концентрациями из серии стандартных разведений.

Для 0- и 1-го отсчётов

$$\frac{(\bar{x}+C_0)z_0}{C_1'} = \frac{S_0}{S_1'} \Rightarrow z_0 = z_{01} = \frac{S_0C_1'}{(\bar{x}+C_0)S_1'}$$

...

Для 0-го и j-го отсчётов

$$\forall j \in \{1,...,m\} \Rightarrow \frac{(\bar{x}+C_0)z_0}{C_j'} = \frac{S_0}{S_j'} \Rightarrow z_{0j} = \frac{S_0C_j'}{(\bar{x}+C_0)S_j'}.$$

Получаем выборку случайной величины ξ_z объёмом m, для которой можно посчитать среднее значение.

$$z_{01}, z_{02}, ..., z_{0j}, ..., z_{0m} \Rightarrow \bar{z}_0 = \frac{1}{m}\sum_{j=1}^{m} z_{0j}$$

$$\forall i, j : i \in \{0,...,n\}, j \in \{1,...,m\} \Rightarrow \frac{(\bar{x}+C_i)z_i}{C_j'} =$$

$$= \frac{S_i}{S_j'} \Rightarrow z_{ij} = \frac{S_iC_j'}{(\bar{x}+C_i)S_j'}$$

$$z_{i1}, z_{i2}, ..., z_{ij}, ..., z_{im} \Rightarrow \bar{z}_i = \frac{1}{m}\sum_{j=1}^{m} z_{ij}$$

Выборку z_{ij} можно представить в виде матрицы $(n+1)x_m$

$$\left\|z_{ij}\right\|_{(n+1)\times m} = \begin{Vmatrix} z_{01} & z_{02} & \cdots & z_{0m} \\ z_{11} & z_{12} & \cdots & z_{0m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ z_{n1} & z_{n2} & \cdots & z_{nm} \end{Vmatrix}.$$

Таким образом, имеется выборка случайной величины ξ_z объёмом $m(n+1)$.

Пусть также вектор средних по строчкам значений запишем:

$$\left\|\bar{z}_i\right\| = \begin{pmatrix} \bar{z}_0 \\ \bar{z}_1 \\ \vdots \\ \bar{z}_n \end{pmatrix}.$$

Откуда выборочное среднее значение % экстракции определяется по формуле:

$$\bar{z} = \frac{1}{n+1}\sum_{i=0}^{n}\bar{z}_i = \frac{1}{n+1}\sum_{i=0}^{n}\frac{1}{m}\sum_{j=1}^{m}z_{ij} = \frac{1}{m(n+1)}\sum_{i=0}^{n}\sum_{j=1}^{m}z_{ij}.$$

Также получаем выборочное СКО % экстракции:

$$s_z = \sqrt{\frac{1}{m(n+1)-1}\sum_i\sum_j(z_{ij}-\bar{z})^2}.$$

Проверка нормальности распределения

Далее распределение полученных выборок необходимо проверить на нормальность. Для этого выдвигаются и проверяются основная (H_0) и альтернативная (H_1) гипотезы.

H_0: Значения измерений концентрации эндогенного вещества подчиняются нормальному закону распределения;

H_1: Значения измерений концентрации эндогенного вещества не подчиняются нормальному закону распределения.

Для выбора критерия проверки предлагается руководствоваться таким параметром, как объём выборки. Если объём выборки менее 40, то можно использовать непараметрический критерий Колмогорова, в противном случае (объём выборки от 40 и более), согласно рекомендации, используется параметрический критерий Пирсона.

Непараметрический критерий Колмогорова строится на основании выборочной функции распределения $F(x)$, которая для вариационного ряда выборки $x_1 \le x_2 \le \ldots \le x_i \le \ldots \le x_N$ равна:

$$F(x) = \begin{cases} 0, x < x_1 \\ \dfrac{i}{N}, x_i \le x \le x_{i+1}, i \in \overline{\{1, N-1\}} \\ 1, x < x_N \end{cases}.$$

Проверяется степень различия выборочной $F(x)$ и гипотетической $F_0(x)$ функций распределения. В качестве меры отклонения считается максимальная по модулю разница между этими функциями:

$$D = \max\left|F(x) - F_0(x)\right|.$$

По теореме Колмогорова оценивается вероятность того, что расхождение между гипотетической и выборочной функцией распределения будет иметь полученное значение D. Теорема Колмогорова выглядит следующим образом:

$$\lim_{N\to\infty} P(\sqrt{N}D < \lambda) = k(\lambda),$$

где: $k(\lambda)$ — функция Колмогорова.

Таким образом, для проверки по критерию Колмогорова заданной выборки на нормальность, необходимо:

1) выбрать число интервалов для x и их границы;

2) определить для этих интервалов значения выборочной $F(x)$ и гипотетической $F_0(x)$ функций распределения;

3) определить максимальный модуль отклонения D этих функций по всем интервалам;

4) посчитать значение критерия для нашей конкретной выборки

$$\lambda = D\sqrt{N};$$

6) задаться уровнем значимости α для проверки гипотезы;

7) посчитать критическое значение λ_α из формулы:

$$\lim_{N\to\infty} P(\lambda < \lambda_\alpha) = k(\lambda_\alpha) = 1 - \alpha;$$

8) сравнить значение критерия и критического значения.

Если $\lambda < \lambda_\alpha$, то гипотеза H_0 принимается с уровнем значимости α, т. е. делается вывод о нормальности закона распределения. Если $\lambda \ge \lambda_\alpha$, то гипотеза H_0 отвергается с уровнем значимости α.

Критерий Пирсона / Pearson's criterion

Параметрический критерий Пирсона строится на основании выборочной функции плотности вероятности.

Проверяется степень различия выборочной и гипотетической вероятностных функций. В качестве меры отклонения считается взвешенная сумма квадратов отклонений между выборочной и гипотетической вероятностными функциями:

$$Z = N\sum_{i=1}^{r}\frac{1}{p_i}\left(\frac{\nu_i}{N} - p_i\right)^2.$$

Распределение данной величины в случае нормального распределения выборки подчиняется закону хи-квадрат χ^2. На этом и основан критерий Пирсона.

Таким образом, для проверки по критерию Пирсона заданной выборки на нормальность, необходимо:

1) выбрать число интервалов для x и их границы;

2) определить для этих интервалов значения выборочной $\frac{\nu_i}{N}$ и гипотетической p_i вероятностных функций;

3) посчитать значение критерия для нашей конкретной выборки;

4) задаться уровнем значимости α для проверки гипотезы;

5) определить критическое значение $\chi^2_{\alpha,r\text{-}l\text{-}1}$ с r-l-1 степенями свободы, где r – количество интервалов, l – количество параметров, которые оцениваются из выборки (для нормального распределения их 2 – среднее и СКО);

6) сравнить значение критерия и критического значения.

Если $Z < \chi^2_{\alpha,r-l-1}$, то гипотеза H_0 принимается с уровнем значимости α, т. е. делается вывод о нормальности закона распределения. Если $Z \geq \chi^2_{\alpha,r-l-1}$, то гипотеза H_0 отвергается с уровнем значимости α.

Проверка на промахи / Check for outliers

Для обнаружения грубых ошибок (выбросов) можно воспользоваться *критерием Граббса*, в котором проверяются максимальные и минимальные значения выборки, для которых вычисляются следующие значения критерия:

$$G_1 = \frac{|\max_{i,j,i<j}(x_{ij}) - \bar{x}|}{S_{\bar{x}}}; \quad G_2 = \frac{|\min_{i,j,i<j}(x_{ij}) - \bar{x}|}{S_{\bar{x}}}$$

Критическое значение критерия Граббса G_T является табулированным значением.

Если $G_1 > G_T$, то значение $\max(x_{ij})$ считают промахом и исключают из выборки и дальнейшей обработки результатов измерений. Если $G_2 > G_T$, то значение $\min(x_{ij})$ считают промахом и исключают из выборки и дальнейшей обработки результатов измерений.

Интервальная оценка / Interval estimation

Получим интервальную оценку математического ожидания (неизвестной концентрации x).

$$\mu_x = \mu_{\bar{x}} = \mu; \quad s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{N}}; \quad \frac{\bar{x}-\mu}{s_{\bar{x}}} = \frac{\bar{x}-\mu}{s_x}\sqrt{N} \in t_{N-1},$$

где t_{N-1} — распределение Стьюдента с числом степеней свободы $N-1$.

Зададимся уровнем значимости $\alpha = 1 - P$ или доверительной вероятностью $P = 1 - \alpha$.

Пусть необходимо найти интервал, в котором окажется значение μ_x с вероятностью, например, 90 %, т. е. $p = 0{,}9$ (или $\alpha = 0{,}1$).

Возьмём 2 квантиля распределения Стьюдента $t_{N-1,\frac{\alpha}{2}}$ и $t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}$ ($t_{N-1,0.05}$ и $t_{N-1,0.95}$).

Вероятность того, что случайная величина $\frac{\bar{x}-\mu}{s_x}\sqrt{N}$ находится в интервале от $t_{N-1,\frac{\alpha}{2}}$ до $t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}$ равна

$$T(t_{N-1,\frac{\alpha}{2}}) - T(t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}) = 1 - \frac{\alpha}{2} - \frac{\alpha}{2} = 1 - \alpha = P = 0{,}9,$$

т. к. распределение Стьюдента симметрично, то $t_{N-1,\frac{\alpha}{2}} = -t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}$

$$P\left(t_{N-1,\frac{\alpha}{2}} < \frac{\bar{x}-\mu}{s_x}\sqrt{N} < t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}\right) = 1-\alpha;$$

$$P\left(-t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}} < \frac{\bar{x}-\mu}{s_x}\sqrt{N} < t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}\right) = 1-\alpha;$$

$$P\left(-\frac{t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}s_x}{\sqrt{N}} < \bar{x}-\mu < \frac{t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}s_x}{\sqrt{N}}\right) = 1-\alpha;$$

$$P\left(-\bar{x}-\frac{t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}s_x}{\sqrt{N}} < -\mu < -\bar{x}+\frac{t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}s_x}{\sqrt{N}}\right) = 1-\alpha;$$

$$P\left(\bar{x}-\frac{t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}s_x}{\sqrt{N}} < \mu < \bar{x}+\frac{t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}s_x}{\sqrt{N}}\right) = 1-\alpha.$$

Таким образом, доверительный интервал

$$\left[\bar{x}-\frac{t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}s_x}{\sqrt{N}}; \bar{x}+\frac{t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}s_x}{\sqrt{N}}\right].$$

Абсолютная погрешност

$$\Delta_{\bar{x}} = \frac{t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}s_x}{\sqrt{N}} = t_{N-1,1-\frac{\alpha}{2}}s_{\bar{x}}.$$

Аналогичную обработку и оценку проводят также и для % экстракции.

Заключение / Conclusion

Разработана математическая методика расчёта концентрации эндогенных соединений в биообъектах, измеренной методом хроматографии, которая позволяет получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений. Особенностью данной методики является использование исключительно анализируемого биообъекта для проведения количественного определения эндогенных веществ, без использования так называемых «чистых» биообъектов для калибровочных кривых. Это позволяет сохранить оригинальный биоматричный эффект при снятии хроматограммы. Также используется статистический аппарат для исключения возможных грубых ошибок.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. Красных Л.М. — оформление рукописи, работа с графическим материалом, редактирование и переработка рукописи; Смирнов В.В. — обоснование концепции исследования, планирование хроматографических и математических исследований, проведение сравнительного анализа, разработка дизайна экспериментального исследования, проведение хроматографических исследований, обобщение результатов исследования, формулировка выводов, интерпретация результатов исследования; Раменская Г.В. — консультация по вопросам планирования

эксперимента и оформления рукописи; Казанбеков С.Б. — анализ и обобщение данных литературы, сбор данных литературы, сбор и систематизация данных, разработка математической модели.

Participation of authors. Krasnykh LM — the manuscript, work with graphic material, manuscript editing and revision; Smirnov VV — substantiation of the research concept, planning of chromatographic and mathematical studies, comparative analysis, development of experimental research design, chromatographic research, generalization of research results, formulation of conclusions, interpretation of research results; Ramenskaya GV — consultation on the planning of the experiment and the design of the manuscript; Kazanbekov S.B. — Analysis and synthesis of literature data, collection of literature data, data collection and systematization, development of a mathematical model.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Financing. This work was carried out as part of the state assignment of FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of Russia No. 056-00003-20-00 for conducting applied research (state registration number AAAA-A18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interest requiring disclosure in this article.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Смирнов Валерий Валерьевич
Автор, ответственный за переписку
e-mail: vall@mail.mipt.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8232-6682
д. фармац. н., профессор ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Smirnov Valery V.
Corresponding author
e-mail: vall@mail.mipt.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8232-6682
D. Sci. in Pharmaceutical, professor FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy Uneversity), Moscow, Russia

Красных Людмила Михайловна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-3650-6014
к. б. н. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия

Krasnykh Ludmila M.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-3650-6014
Cand. Sci. Biology FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Раменская Галина Владиславовна
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8779-3573
д. фарм. н., профессор ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Ramenskaya Galina V.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8779-3573
D. Sci. in Pharmaceutical, professor FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy Uneversity), Moscow, Russia

Казанбеков Салман Бинямиевич
Аспирант ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Kazanbekov Salman B.
PhD student of FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy Uneversity), Moscow, Russia

Литература / References

1. Петухова О.А., Раменская Г.В. Разработка селективной методики количественного определения тиамина в плазме крови. *Бюллетень медицинских Интернет-конференций*, 2013;3(3);607. [Petukhova OA, Ramenskaya GV. Development of a selective method for the quantitative determination of thiamine in blood plasma. *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2013;3(3);607. (In Russ).].

2. Bolton S., Bon Ch. Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications, Fifth Edition. / Drugs and Pharmaceutical Sciences, New York: Informa Healthcare USA, 2010, 203, 656 p. [Bolton S., Bon Ch. Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications, Fifth Edition. / Drugs and Pharmaceutical Sciences, New York: Informa Healthcare USA, 2010, 203, 656 p.]

3. Смирнов В.В. Разработка методики определения кортизола и 6-бета-гидроксикортизола в моче с целью установления активности изофермента CYP 3A4: Дис. канд. фарм. наук. – Москва; 2011 [Smirnov VV. Development of a method for determination of cortisol and 6-beta-hydroxycortisol in urine in order to establish the activity of CYP 3A4 isoenzyme. [dissertation] Moscow; 2011. (In Russ).].

Антиаритмические свойства монохлоргидрата N-дезацетиллаппаконитина

Крыжановский С. А.[1], Юнусов М. С.[2], Цорин И. Б.[1], Барчуков В. В.[1], Барчукова Е. И.[1]

[1] – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия
[2] – Уфимский Институт химии ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа, Россия

Аннотация. *Цель исследования* – изучить антиаритмические свойства монохлоргидрата N-дезацетиллаппаконитина. Установлено, что изучаемое вещество эффективно на модели нарушений ритма сердца, вызываемых аконитина гидрохлоридом, но не действует на моделях хлоридкальцевых и реперфузионных фибрилляций желудочков сердца. Изучаемое соединение менее токсично, чем препарат сравнения лаппаконитина гидробромид, и действует в меньших дозах на аконитиновой модели аритмий. Монохлоргидрат N-дезацетиллаппаконитина, по-видимому, является антиаритмическим средством I класса по классификации Vaughan Williams.

Ключевые слова: монохлоргидрат N-дезацетиллаппаконитина; лаппаконитина гидробромид, аритмии; фибрилляции желудочков

Для цитирования:
Крыжановский С. А., Юнусов М. С., Цорин И. Б., Барчуков В. В., Барчукова Е. И. Антиаритмические свойства монохлоргидрата N-дезацетиллаппаконитина. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2021;(2):19–24. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-19-24
Поступила: 18 июля 2021 г. **Принята:** 13 августа 2021 г. **Опубликована:** 10 ноября 2021 г.

Antiarrhythmic properties of N-Deacetyllappaconitine Hydrochloride

Kryzhanovskii SA[1], Yunusov MS[2], Tsorin IB[1], Barchukov VV[1], Barchukova EI[1]

[1] – FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia
[2] – Ufa Institute of Chemistry UFRC RAS, Ufa, Russia

Abstract. The aim of the investigation was the research of the N-deacetyllappaconitine hydrochloride antiarrhythmic properties. It was found that the studied substance was effective on the cardiac arrhythmias model caused by aconitine hydrochloride, but does not act on the models of calciume chloride-induced arrhythmias and reperfusion ventricular fibrillation. The studied compound is less toxic than the comparison drug lappaconitine hydrobromide and acts in lower doses on the aconitine model of arrhythmias. N-Deacetyllappaconitine hydrochloride appears to be a Class I antiarrhythmic agent according to the Vaughan Williams classification.

Keywords: N-deacetyllappaconitine hydrochloride; lappaconitine hydrobromide; arrhythmias; ventricular fibrillation

For citations:
Kryzhanovskii SA, Yunusov MS, Tsorin IB, Barchukov VV, Barchukova EI. Antiarrhythmic properties of N-Deacetylappaconitine Hydrochloride. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2021;(2):19–24. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-19-24
Received: July 18, 2021. **Accepted:** August 13, 2021. **Published:** November 10, 2021

Введение / Introduction

Нарушения ритма сердца являются распространёнными и опасными осложнениями многих заболеваний, в том числе ИБС. Именно поэтому поиск новых эффективных и безопасных антиаритмических средств является одной из приоритетных задач, стоящих перед современной кардиофармакологией. В настоящее время в клинике с успехом применяют антиаритмик лаппаконитина гидробромид (син. аллапинин) – алкалоид, получаемый из растения аконит белоустный (лат. *Aconítum leucostómum*). Согласно классификации Vaughan Williams, лаппаконитина гидробромид относится к антиаритмическим лекарственным средствам IC класса. Антиаритмики IC класса – это т. н. мембраностабилизирующие препараты, являющиеся блокаторами трансмембранных потенциалзависимых быстрых натриевых каналов [1, 2]. Антиаритмическое действие этих препаратов основано на удлинении фаз быстрой и медленной деполяризации. Удлинение фазы быстрой деполяризации увеличивает продолжительность переднего фронта потенциалов действия, а удлинение фазы медленной деполяризации увеличивает интервал между ними и уменьшает частоту сокращений сердца [3–5].

Лаппаконитина гидробромид используют для лечения больных с различными наджелудочковыми и желудочковыми тахиаритмиями, в том числе нарушений сердечного ритма при синдроме Вольфа–Паркинсона–Уайта. Однако, также как и другие антиаритмики IC класса, он обладают большим количеством побочных эффектов, в том числе и проаритмическим действием [1, 2]. В связи с изложенным, представляется перспективным создание на базе лаппаконитина гидробромида нового оригинального отечественного лекарственного препарата, как минимум, не уступающего по своей целевой эффективности прототипу, но реализующего свое действие в меньших дозах, что потенциально существенно снижает риск возникновения побочных эффектов. Таким потенциальным лекарственным средством может стать монохлоргидрат N-дезацетиллаппаконитина (ХДАЛ), являющийся метаболитом лаппаконитина гидробромида (аллапинина).

Цель исследования / Purpose of the study. Изучение спектра антиаритмической активности ХДАЛ.

Материалы и методы / Material and methods

Экспериментальные животные /The experimental animals. Эксперименты выполнены на беспородных белых мышах и крысах самцах, полученных из Филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при контролируемом освещении (12 ч – свет/12 ч – темнота) и постоянной температуре (21–23 °С) со свободным доступом к воде и брикетированному корму в течение 10 суток до начала тестирования. Условия содержания животных соответствовало приказу МЗ РФ № 199н от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», международными правилами (European Communities Council Directive of November 24,1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Используемые вещества / The substances used: апирогенная вода для инъекций (Solopharm), изотонический 0,9 % раствор натрия хлорида (Красфарм), изопротеренол (Sigma), уретан (Aldrich), кальция хлорид 10 % раствор (ОАО Дальхимфарм), аконитина гидрохлорид (УФИЦ РАН), лаппаконитина гидробромид (УФИЦ РАН), монохлоргидрат N-дезацетиллаппаконитина – ХДАЛ (УФИЦ РАН).

Изучение показателей токсичности / The toxicity indicators studing. Эксперименты выполнены на беспородных белых мышах самцах массой 18–20 г. Животные были рандомизированы на 10 групп по 6 животных в каждой: 1–5-я получали монохлоргидрат N-дезацетиллаппаконитина в дозах 15; 17,5; 20; 22,5 и 25 мг/кг в/б, соответственно; 6–10-я – лаппаконитина гидробромид в дозах 7,5; 10; 12,5; 15 и 20 мг/кг в/б, соответственно. В качестве растворителя использовали апирогенную воду для инъекций. Летальность животных оценивали через 24 часа после введения изучаемых соединений. Показатели токсичности соединений (LD_{16}, LD_{50}, LD_{84}) и их 95 % ДИ (доверительные интервалы) рассчитывали по Финни с помощью программы «Биостат 2009».

Изучение антиаримической активности веществ на модели нарушений ритма сокращений сердца, вызванных аконитина гидрохлоридом / The studying antiarrhythmic activity of substances on the model of cardiac arrhythmias caused by aconitine hydrochloride. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах самцах массой 160–180 г. Животные были рандомизированы на 6 групп: 1-я (n = 8) – контроль для ХДАЛ; 2-я (n = 6) получала ХДАЛ (0,5 мг/кг, в/в); 3-я (n = 6) получала ХДАЛ (0,25 мг/кг, в/в); 4-я (n = 13) – контроль для лаппаконитина гидробромида; 5-я (n = 6) – лаппаконитина гидробромид (0,5 мг/кг, в/в); 6-я (n = 6) – лаппаконитина гидробромид (0,25 мг/кг, в/в).

Наркотизированных животных (уретан 1300 мг/кг, в/б) фиксировали в положении на спине на подогреваемом операционном столике. Катетеризировали левую бедренную вену для введения аконитина и изучаемых соединений. Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (стандартные отведения, калибровочный сигнал 20 мВ, скорость записи 50 мм/сек, продолжительность записи 60 секунд). В качестве регистратора использовали компьютерный электрокардиограф «Поли-Спектр 8/В» (Россия). Затем подбирали дозу аконитина гидрохлорида (n = 15 в/в, болюсом), которая во всех экспериментах в пределах 1–2 минут после окончания его введения вызывает смешанную предсердно-желудочковую экстрасистолию; величина подобранной дозы – 30 мкг/кг. После подбора дозы аконитина гидрохлорида во всех сериях экспериментов изучаемые соединения вводили в/в (в 0,2–0,3 мл апирогенной воды для инъекций) за 2 минуты до введения аконитина. Непрерывную регистрацию ЭКГ начинали за 2 минуты до начала введения аконитина или исследуемых соединений и продолжали в течение 20 минут от момента окончания в/в введения аконитина [6].

В каждой экспериментальной группе подсчитывали число животных, у которых возникала политопная экстрасистолия (ПЭС), и число крыс с нарушениями ритма сердца (ПЭС+бигемения).

Изучение противофибриллятороой активности веществ на модели хлоридкальцевой аритмии / The studying antifibrillatory activity of substances on a calcium chloride arrhythmia model. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах самцах массой 200–250 г. Животные были рандомизированы на 4 группы: 1-я (n = 7) – контроль для ХДАЛ; 2-я (n = 8) получала ХДАЛ (0,5 мг/кг, в/в); 3-я (n = 6) – контроль для лаппаконитина гидробромида; 4-я (n = 6) – получала лаппаконитина гидробромид (0,5 мг/кг, в/в).

Наркотизированных животных (уретан 1300 мг/кг, в/б) фиксировали в положении на спине на подогреваемом операционном столике. Катетеризировали левую бедренную вену для введения хлорида кальция и изучаемых соединений. Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (стандартные отведения, калибровочный сигнал 20 мВ, скорость записи 50 мм/сек, продолжительность записи 60 секунд). В качестве регистратора использовали компьютерный электрокардиограф «Поли-Спектр 8/В» (Россия). Затем подбирали дозу хлорида кальция (n = 12, в/в, болюсом), которая во всех экспериментах в пределах

1–2 минут после окончания его введения вызывает фибрилляцию желудочков сердца. После подбора дозы хлорида кальция во всех сериях экспериментов изучаемые соединения вводили в/в (в 0,2–0,3 мл апирогенной воды для инъекций) за 2 минуты до введения хлорида кальция. Непрерывную регистрацию ЭКГ начинали за 2 минуты до начала введения хлорида кальция или исследуемых соединений и продолжали в течение 20 минут от момента окончания в/в введения хлорида кальция [6].

Изучение противофибрилляторной активности веществ на модели реперфузионных фибрилляций желудочков сердца у крыс / The studing antifibrillatory activity of substances on a model of reperfusion heart ventricles fibrillation in rats. Эксперименты выполняли на беспородных белых крысах самцах массой 350–450 г. Животные были рандомизированы на 5 групп: 1-я (n = = 12) – контроль для ХДАЛ; 2-я (n = 14) получала ХДАЛ (0,5 мг/кг,/в); 3-я (n = 5) – ХДАЛ (1,0 мг/кг,/в); 4-я (n = 16) – контроль для лаппоконитина гидробромида (1,0 мг/кг, в/в); 5-я (n = 10) – лаппаконитина гидробромид (0,5 мг/кг, в/в).

Наркотизированных (уретан 1300 мг/кг, в/б) животных переводили на искусственное дыхание при помощи аппарата искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия), после чего производили тороко- и перикардотомию и под левую нисходящую коронарную артерию сразу же после её выхода из-под ушка подводили лавсановую лигатуру. Ишемию миокарда вызывали одномоментной перевязкой коронарной артерии. Через 8 минут лигатуру снимали. Оценивали наличие/отсутствие фибрилляции желудочков сердца в течение 3 минут от момента начала реперфузии. Исследуемые соединения (в/в, в 0,2–0,3 мл апирогенной воды для инъекций), а в контрольной серии — апирогенную воду для инъекций вводили за 5 минут до начала реперфузии. Регистрацию ЭКГ (II стандартное отведение) начинали за минуту до перевязки коронарного сосуда и продолжали в течение всего эксперимента. В работе использовали цифровой электрокардиограф Поли-Спектр-8В (Нейрософт, Россия).

Для оценки противофибрилляторного и антиаритмического действия в каждой группе подсчитывали число животных, у которых возникали: не фибрилляция желудочков сердца (ФЖ), опасные для жизни аритмии (ОЖА) – фибрилляция желудочков сердца или желудочковая тахикардия, экстрасистолия. С помощью балльного шкалирования оценивали тяжесть аритмогенеза: отсутствие аритмий – 0 баллов; экстрасистолия – 1 балл; желудочковая тахикардия – 2 балла; ФЖ с последующим восстановлением ритма – 3 балла; ФЖ, приводящая к остановке сердца – 4 балла.

Статистическая обработка полученных данных / Statistical analysis. Измеренные в бинарной шкале данные обрабатывали с помощью метода точной вероятности Фишера с учётом множественности сравнений. Обработку результатов, полученных с использованием балльного шкалирования, проводили с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа по Крускалу–Уоллесу с дальнейшим анализом методом множественных сравнений по Данну. Результаты представлены в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей. Различия считали значимыми при $p \le 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Анализ показателей токсичности изучаемых веществ позволил установить, что ХДАЛ обладает меньшей токсичностью по сравнению с лаппаконитина гидробромидом (табл. 1). Так, если LD_{50} лаппаконитина гидробромида у мышей в условиях в/б введения была равна 10,2 (8,0÷12,9) мг/кг, то для ХДАЛ этот показатель составлял 20,7 (17,8÷25,5) мг/кг. Таким образом, лаппаконитина гидробромид относится ко 2-му классу токсичности (высокотоксичные соединения), а МХДАЛ – к 3-му классу (умереннотоксичные вещества) [7].

Таблица 1

Показатели токсичности монохлоргидрата N-дезацетиллаппаконитина (ХДАЛ) и лаппаконитина гидробромида

Table 1

Toxicity indicators of N-deacetylappaconitin monochlorohydrate (CDAL) and lappaconitin hydrobromide

Вещество / The substance	LD_{16}, мг/кг/ mg/kg	LD_{50}, мг/ кг/mg/kg	LD_{84}, мг/кг / mg/kg
ХДАЛ	16,3 8,8÷18,6	20,7 17,8÷25,5	26,3 22,7÷56,0
Лаппаконитина гидробромид	7,5 7,2÷7,9	10,2 8,0÷12,9	13,8 13,1÷14,4

Анализ антиаритмических эффектов ХДАЛ и лаппаконитина гидробромида на аконитиновой модели нарушений ритма сердца свидетельствует о том, что оба вещества на данной модели обладают выраженным антиаритмическим действием (табл. 2). Однако ХДАЛ более эффективен по сравнению с лаппаконитина гидробромидом. Так, если в контрольной серии опытов политопная экстрасистолия после введения аконитина гидрохлорида возникали у всех 8 животных, то у крыс, получавших ХДАЛ в дозе 0,5 мг/кг, нарушения ритма сердца в течение всего периода наблюдения отсутствовали (n = 6, p < 0,001). В группе животных, получавших изучаемое вещество в дозе 0,25 мг/кг, у двух крыс из 6 возникала бигемения (p = 0,03), случаи политопной экстрасистолии отсутствовали.

Эталонный препарат – лаппаконитина гидробромид в дозе 0,5 мг/кг также обладал выраженным антиаритмическим эффектом, однако, в отличие от ХДАЛ, лаппаконитина гидробромид в дозе 0,25 мг/кг не предотвращал возникновения аритмий, вызываемых аконитином (табл. 2).

Таблица 2

Влияние ХДАЛ и лаппаконитина гидробромида на нарушения ритма сердца, вызываемые у крыс аконитина гидрохлоридом

Table 2

The effect of CDAL and lappaconitine hydrobromide on cardiac arrhythmias caused by aconitine hydrochloride in rats

Соединение / Substance	Доза, мг/кг /Dose mg/kg	Число крыс в группе /Number of rats in the group	Число крыс с нарушениями ритма / Number of rats with arrhythmias	Число крыс с политопными экстрасистолиями / Number of rats with polytopic extrasystoles
Контроль	–	8	8	8
ХДАЛ	0,5	6	0 $p < 0,001$	0 $p < 0,001$
	0,25	6	2 $p = 0,03$	0 $p < 0,001$
Контроль	–	13	13	13
Лаппаконитина гидробромид	0,5	6	0 $p < 0,001$	0 $p < 0,001$
	0,25	6	4 $p = 0,1754$	3 $p = 0,0618$

Примечание: p – указано по отношению к контролю.
Note: p – indicated in relation to the control.

Таким образом, сравнительное изучение антиаритмической активности эталонного препарата лаппаконитина гидробромида и ХДАЛ на модели аконитиновой аритмии, патогномоничной для антиаритмических средств 1 класса по классификации Vaughan Williams, свидетельствует о том, что оба соединения на этой модели обладают антиаритмическим действием, опосредуемым блокадой натриевых каналов [2]. Вместе с тем, ХДАЛ реализует свое антиаритмическое действие в существенно меньшей дозе.

На модели хлоридкальцевой аритмии ни лаппаконитина гидробромид, ни ХДАЛ не предотвращали возникновения летальных фибрилляций желудочков сердца (табл. 3).

Анализ результатов изучения антифибрилляторной активности исследуемых лекарственных веществ на модели реперфузионных аритмий у крыс показал, что ХДАЛ в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг не обладает антиаритмическим и противофибрилляторным действием. Лаппаконитина гидробромид в дозе 0,5 мг/кг, напротив, обладал выраженным антиаритмическим и противофибрилляторным эффектом (табл. 4). Так, если в контрольной серии экспериментов аритмии наблюдались у всех 16 крыс, а фатальные фибрилляции желудочков возникали в 12 случаях (что соответствует данным литературы [8]), то у животных, которые получали лаппаконитина гидробромид, аритмии возникали в 6 случаях из 10 ($p = 0,023$), а фатальные фибрилляции желудочков только в 1 случае ($p = 0,006$), при этом тяжесть аритмогенеза снижалась с 3 до 1 балла ($p = 0,02$). Следует отметить, что во всех случаях фатальные фибрилляции желудочков возникали в период реперфузии.

Таким образом, как следует из полученных данных, на модели реперфузионных аритмий у крыс ХДАЛ, в отличие от эталонного препарата лаппаконитина

Таблица 3

Влияние ХДАЛ и лаппаконитина гидробромида на частоту возникновения летальных фибрилляций желудочков сердца, вызываемых кальция хлоридом у наркотизированных (уретан 1300 мг/кг в/б) крыс

Table 3

Effect of CDAL and lappaconitin hydrobromide on the incidence of fatal ventricular fibrillation caused by calcium chloride in anesthetized (urethane 1300 mg/kg i.p.) rats

Вещество / Substanct	Доза, мг/кг /Dose, mg/kg	Число животных в группе Number of animals in group	Число крыс, у которых возникли летальные ФЖ /The number of rats that have experienced fatal VF
Контроль	–	7	7
ХДАЛ	0,5	8	5 $p = 0,2$
Контроль	–	6	6
Лаппаконитина гидробромид	0,5	6	6 $p = 1,0$

Примечание: p – указано по отношению к контролю.
Note: p – indicated in relation to the control.

Таблица 4

Влияние ХДАЛ и лаппаконитина гидробромида на частоту возникновения ФЖ и других нарушений ритма сердца, вызываемых окклюзией и последующей реперфузией коронарной артерии у крыс, наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б)

Table 4

Effect of CDAL and lappaconitin hydrobromide on the incidence of VF and other cardiac arrhythmias caused by occlusion and subsequent reperfusion of the coronary artery in rats anesthetized with urethane (1300 mg/kg, i.p.)

Соединение / Substance	Доза, мг/кг / Dose mg/kg	Число крыс в группе / Number of rats in group	Число крыс с нарушениями ритма сердца / Number of rats with heart rhythm disorders	Число крыс с ОЖА / Number of rats with LTA	Число крыс с ФЖ / Number of rats with VF	Тяжесть аритмогенеза в баллах / Severity of arrhythmogenesis in points
Контроль	–	12	12	11	6	2,5 2÷4
ХДАЛ	0,5	14	13 $p = 1,0$	9 $p = 0,17$	6 $p = 1,0$	2 1÷4 $p = 1,0$
	1,0	5	5 $p = 1,0$	5 $p = 1,0$	3 $p = 1,0$	4 2÷4 $p = 1,0$
Контроль	–	16	16	13	12	3 3÷3
Лаппаконитина гидробромид	0,5	10	6 $p = 0,023$	2 $p = 0,01$	1 $p = 0,006$	1 0÷1 $p = 0,020$

Примечание: В столбце «Тяжесть аритмогенеза в баллах» представлены медианы и нижний и верхний квартили; p – указано по отношению к контролю.
Note: The column «Severity of arrhythmogenesis in points» shows the medians and the lower and upper quartiles; p is indicated in relation to the control.

гидробромида, не проявляет антиаритмическую и противофибрилляторную активность.

Заключение / Conclusion

ХДАЛ обладает меньшей токсичностью по сравнению с эталонным препаратом IC класса лаппаконитина гидробромидом, при этом высокоэффективен на модели аконитиновой аритмии, которая патогномонична для антиаритмических средств I класса по классификации Vaughan Williams. На модели хлоридкальциевой аритмии, патогномоничной для антиаритмических средств IV класса, ХДАЛ, так же как лаппаконитина гидробромид, противофибрилляторным действием не обладает. ХДАЛ, в отличие от эталонного препарата лаппаконитина гидробромида, не эффективен на модели реперфузионных нарушений ритма.

Выводы / Conclusions

1. ХДАЛ обладает выраженным антиаритмическим эффектом на модели нарушений ритма сердца, вызываемых аконитина гидрохлоридом. Вещество не действует на хлоридкальцевой модели аритмий и модели реперфузионных фибрилляций желудочков сердца.

2. ХДАЛ, по-видимому, является антиаритмическим средством I класса по классификации Vaughan Williams.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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

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

Юнусов Марат Сабирович
SPIN-код: 4308-3287
д. х. н., профессор, академик РАН, гл. н. с. УфИХ УФИЦ РАН, Уфа, Россия

Yunusov Marat S.
SPIN code: 4308-3287
D. Sci. in Chemistry, academician of RAS, Chief researcher, Ufa Institute of Chemistry UFRC RAS

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

Tsorin Iosif B.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-3988-7724
SPIN code: 4015-3025
D. Sci. in Biology, Leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Барчуков Владимир Валерьевич
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4229-3107
SPIN-код: 6743-4280
н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Barchukov Vladimir V.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4229-3107
SPIN code: 6743-4280
Research scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Барчукова Елена Игоревна
м. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Barchukova Elena I.
Research Assistant of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Фогорос Р.М. Антиаритмические средства. – М.: «Бином»; 1999. – 189 с. [Fogoros RM. Antiaritmicheskie sredstva. Moscow: «Binom»; 1999. (In Russ).].

2. Крыжановский С.А., Вититнова М.Б. Антиаритмические лекарственные средства. – М.: Издательский центр «Академия»; 2008. – 206 с. [Kryzhanovskii SA, Vititnova MB. Antiaritmicheskie lekarstvennye sredstva. Moscow: Izdatel'skii tsentr «Akademiya»; 2008. (In Russ).].

3. Соловьян А.Н., Михалева Т.В., Михалев К.А. Классификация и механизмы действия антиаритмических препаратов. *Ліки України*. 2015;190(4):12–20. [Solov'yan AN, Mikhaleva TV, Mikhalev KA. Klassifikatsiya i mekhanizmy deistviya antiaritmicheskikh preparatov. *Liki Ukraini*. 2015;190(4):12–20. (In Ukraine).].

4. Issa Z, Miller J, Zipes D. Clinical arrhythmology and electrophysiology: A companion to Braunwald's heart disease. 1st ed. Philadelphia: Saunders; 2012.

5. Burashnikov A, Antzelevitch C. Role of late sodium channel current block in the management of atrial fibrillation. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013;27(1):79–89. DOI: 10.1007/s10557-012-6421-1.

6. Галенко-Ярошевский П.А., Каверина Н.В., Камкин А.Г., Тарилова А.И., Богус С.К., Шейх-заде Ю.Р. Методические рекомендации по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств. – В кн. «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Часть I. – М.: Гриф и К; 2013. – 385–416. [Galenko-Yaroshevskii PA, Kaverina NV, Kamkin AG, Tarilova AI, Bogus SK, Sheikh-zade YuR. Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniyu antiaritmicheskikh lekarstvennykh sredstv. – V kn. «Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanii lekarstvennykh sredstv». Chast' I. Moscow: Grif i K; 2013. (In Russ).].

7. Сидоров К.К. Токсикология новых промышленных химических веществ. – Вып. 13, Л.: «Медицина»; 1973. – С. 47–51. [Sidorov K.K. Toksikologiya novykh promyshlennykh khimicheskikh veshchestv. Vyp.13, Leningrad: «Meditsina»; 1973. (In Russ).].

8. Krzeminski T, Grzyb J, Kurcok A, Brus R. Ischemia and reperfusion-induced early arrhythmias in vivo: cardioprotective effects of difibrotide. Pol. *J. Pharmacol. and Pharm.* 1992;44(Suppl.):169–170.

Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функциональную активность транспортёра гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере крыс в норме и при гипоксической гипоксии

Мыльников П. Ю., Щулькин А. В., Черных И. В., Якушева Е. Н.

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, Россия

Аннотация. *Актуальность.* Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) – референтный отечественный лекарственный препарат, обладающий выраженной антиоксидантной и антигипоксической активностью. Гликопротеин-Р (Pgp) – АТФ-зависимый белок-транспортёр, локализующийся в тканевых барьерах и осуществляющий защиту клеток и органов от воздействия ксенобиотиков. Экспрессируясь в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ), Pgp ограничивает проникновение лекарственных и токсических веществ в ткань мозга. *Цель* – оценить влияние ЭМГПС на функциональную активность Pgp в ГЭБ крыс в норме и при острой гипоксической гипобарической гипоксии в эксперименте. *Методы исследования.* Исследования выполнены на крысах-самцах Wistar, массой 200–250 г, которые были разделены на 4 группы: 1-я группа (контроль, *n* = 30) – интактные крысы; 2-я группа (контроль гипоксии, *n* = 30) – крысы, которым моделировали гипоксию и перед этим однократно в/в вводили воду для инъекций; 3-я группа (*n* = 30) – интактные животные, которым в/в однократно вводили ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы; 4-я группа (*n* = 30) – крысы, которым перед моделированием гипоксии в/в однократно вводили ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы. Через 30 минут после инъекции у животных 2- и 4-й групп моделировали острую гипоксическую гипоксию в течение 30 минут путём их подъёма на высоту 8000 м со скоростью подъёма и спуска 50 м/с. Через 3 ч после спуска у животных 2- и 4-й групп и через 30 мин после в/в инъекции у животных 1- и 3-й групп оценивали функциональную активность Pgp в ГЭБ по проникновению в ткань мозга фексофенадина – маркерного субстрата Pgp. Для этого крысам в хвостовую вену вводили фексофенадин в дозе 10 мг/кг массы. Через 5, 10, 15, 30, 45, 60 мин после введения их подвергали эвтаназии, забирали не менее 4 мл крови из брюшной аорты в гепаринизированные пробирки и кору лобных долей головного мозга. Концентрацию фексофенадина в биообразцах анализировали методом ВЭЖХ-УФ по оригинальным методикам. *Результаты.* В ходе исследования было показано, что внутривенное однократное введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы вызывает повышение содержания фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга крыс, что свидетельствует о снижении активности белка-транспортёра Pgp. Моделирование острой гипоксической гипоксии также сопровождалось повышением проницаемости субстрата белка-транспортёра в ткань мозга. При этом профилактическое введение ЭМГПС перед гипоксическим воздействием существенно не влияло на проницаемость ГЭБ, которая оставалась существенно выше контроля и не отличалась от проницаемости при изолированном гипоксическом воздействии. *Выводы.* ЭМГПС при однократном внутривенном введении в дозе 50 мг/кг массы снижает активность Pgp в ГЭБ в норме и не оказывает существенного влияния на проникновение в ткань мозга субстрата транспортёра – фексофенадина при острой гипоксической гипоксии.

Ключевые слова: гликопротеин-Р; гематоэнцефалический барьер; этилметилгидроксипиридина сукцинат; гипоксия

Для цитирования:
Мыльников П. Ю., Щулькин А. В., Черных И. В., Якушева Е. Н. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функциональную активность транспортёра гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере крыс в норме и при гипоксической гипоксии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(2):25–30. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-25-30
Поступила: 18 июля 2021 г. **Принята:** 13 августа 2021 г. **Опубликована:** 10 ноября 2021 г.

Effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate on the functional activity of the transporter P-glycoprotein in the blood-brain barrier of rats under normal conditions and under hypoxic hypoxia

Mylnikov PYu, Shchulkin AV, Chernykh IV, Yakusheva EN

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Abstract. *Relevance*. Ethylmethylhydroxypyridine succinate (EMHPS) is a reference domestic drug with pronounced antioxidant and antihypoxic activity. P-Glycoprotein (Pgp) is an ATP-dependent transport protein localized in tissue barriers and protecting cells and organs from the effects of xenobiotics. Being expressed in the blood-brain barrier (BBB), Pgp limits the penetration of drugs and toxic substances into the brain tissue. Aim – to evaluate the effect of EMHPS on the functional activity of Pgp in the BBB of rats in normal conditions and in acute hypoxic hypobaric hypoxia in the experiment. *Methods*. The studies were carried out on male Wistar rats weighing 200–250 g, which were divided into 4 groups: group 1 (control, *n* = 30) – intact rats; Group 2 (control of hypoxia, *n* = 30) – rats, which were simulated hypoxia and before that they were once injected with water for injection; Group 3 (*n* = 30) – intact animals, which were injected intravenously with EMHPS at a dose of 50 mg / kg body weight; Group 4 (*n* = 30) – rats, which were injected intravenously with EMHPS at a dose of 50 mg/kg body weight before modeling hypoxia. 30 minutes after injection, animals of groups 2 and 4 were simulated acute hypoxic hypoxia for 30 minutes by ascending to an altitude of 8000 m with an ascent and descent speed of 50 m/s. 3 h after descent animals of groups 2 and 4 and 30 min after intravenous injection in animals of groups 1 and 3, the functional activity of Pgp in the BBB was assessed by the penetration of fexofenadine, a marker substrate of Pgp, into the brain tissue. For this, fexofenadine was injected into the tail vein of rats at a dose of 10 mg/kg of body weight. After 5, 10, 15, 30, 45, 60 minutes after administration, they were euthanized, at least 4 ml of blood was taken from the abdominal aorta into heparinized tubes and the cortex of the frontal lobes of the brain. The concentration of fexofenadine in biosamples was analyzed by HPLC-UV according to original methods. *Results*. In the course of the study, it was shown that a single intravenous injection of EMHPS at a dose of 50 mg/kg of body weight causes an increase in the content of fexofenadine in the cerebral cortex of rats, which indicates a decrease in the activity of the Pgp transporter protein. Simulation of acute hypoxic hypoxia was also accompanied by an increase in the permeability of the transport protein substrate into the brain tissue. At the same time, the prophylactic administration of EMHPS before hypoxic exposure did not significantly affect the BBB permeability, which remained significantly higher than the control and did not differ from the permeability during isolated hypoxic exposure. *Conclusions*: EMHPS with a single intravenous injection at a dose of 50 mg/kg body weight reduces the activity of Pgp in the BBB in normal conditions and does not significantly affect the penetration of the transporter substrate – fexofenadine into the brain tissue in acute hypoxic hypoxia

Keywords: P-glycoprotein; blood-brain barrier; ethylmethylhydroxypyridine succinate; hypoxia

For citations:
Mylnikov PYu, Shchulkin AV, Chernykh IV, Yakusheva EN. Effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate on the functional activity of the transporter P-glycoprotein in the blood-brain barrier of rats under normal conditions and under hypoxic hypoxia. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2021;(2):25–30. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-25-30
Received: July 18, 2021. **Accepted:** August 13, 2021. **Published:** November 10, 2021

Введение / Introduction

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) – референтный отечественный лекарственный препарат, обладающий выраженной антиоксидантной и антигипоксической активностью. Многочисленными исследованиями доказана его эффективность при широком спектре неврологических заболеваний [1].

Гликопротеин-P (Pgp, ABCB1-белок, MDR1-белок) – АТФ-зависимый мембранный белок-транспортёр, локализующийся в тканевых барьерах, обеспечивающий выведение субстратов из клеток в межклеточное пространство и биологические жидкости. Экспрессируясь в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ), Pgp ограничивает проникновение лекарственных и токсических веществ в ткань мозга, участвуя в фармакокинетическом процессе распределения и выполняя таким образом свою протекторную функцию [2].

Ранее нами было показано, что ЭМГПС в опытах *in vivo* на кроликах породы шиншилла подавляет активность Pgp на уровне целостного организма, оцененную по фармакокинетике маркерного субстрата белка-транспортёра – фексофенадина [3].

Однако влияние ЭМГПС на активность Pgp локально в ГЭБ на данный момент не изучено.

Цель настоящего исследования – оценить влияние ЭМГПС на функциональную активность Pgp в ГЭБ крыс в норме и при острой гипоксической гипобарической гипоксии в эксперименте.

Материалы и методы / Materials and methods

Исследования выполнены на крысах-самцах Wistar, массой 200–250 г, полученных из питомника ООО «КролИнфо» (Московская область, Орехово-Зуевский район, деревня Новая). Исследование одобрено Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных, протокол № 2 от 8 ноября 2017 г.

Животные содержались в условиях конвенционального вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, с системой «чистого» и «грязного» коридоров и автоматической сменой дневного и ночного периода (08:00–20:00 – «день», 20:00–08:00 – «ночь»). В комнате, где содержались животные, поддерживалась температура 21–24 °С и влажность 55–65 %, при как минимум 12-кратной смене воздушного объёма в час.

Все животные были разделены на 4 группы: 1-я группа (контроль, $n = 30$) – интактные крысы; 2-я группа (контроль гипоксии, $n = 30$) – крысы, которым моделировали гипоксию и перед этим однократно в/в вводили воду для инъекций; 3-я группа ($n = 30$) – интактные животные, которым в/в однократно вводили ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы; 4-я группа ($n = 30$) – крысы, которым перед моделированием гипоксии в/в однократно вводили ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы.

Через 30 минут после инъекции у животных 2- и 4-й групп моделировали острую гипоксическую гипоксию в течение 30 минут путём их подъёма на высоту 8000 м со скоростью подъёма и спуска 50 м/с [4]. Через 3 ч после спуска у животных 2- и 4-й групп и через 30 мин после в/в инъекции у животных 1- и 3-й групп оценивали функциональную активность Pgp в ГЭБ по проникновению в ткань мозга фексофенадина – маркерного субстрата Pgp. Для этого крысам в хвостовую вену вводили фексофенадин («Sanofy», Франция) в дозе 10 мг/кг массы. Через 5, 10, 15, 30, 45, 60 мин после введения их подвергали эвтаназии, забирали не менее 4 мл крови из брюшной аорты в гепаринизированные пробирки и кору лобных долей головного мозга.

Для экстракции фексофенадина из плазмы крови к 1,5 мл плазмы прибавляли 4 мл ацетонитрила («ACROS ORGANICS», Бельгия) категории «Для ВЭЖХ», встряхивали на приборе Vortex в течение 15 мин и центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин.

Экстракцию фексофенадина из ткани коры больших полушарий головного мозга крыс выполняли следующим образом. Образцы мозга массой 500 мг гомогенизировали в 500 мкл воды деионизированной в течение 1 мин, после чего экстрагировали фексофенадин добавлением 4 мл ацетонитрила («ACROS ORGANICS», Бельгия) и встряхиванием на приборе Vortex в течение 15 мин с последующим центрифугированием 15 мин при 3500 об/мин.

Количественное определение фексофенадина в плазме крови крыс и в гомогенате головного мозга производили методом ВЭЖХ на хроматографической системе «Stayer» с УФ-спектрофотометрическим детектированием с колонкой Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250×4,6) с зернением 4 мкм и термостатированием при 35 °С при длине волны 220 нм. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила («ACROS ORGANICS», Бельгия, «Для ВЭЖХ»), 267,4 мл воды деионизированной, 7,0 мл триэтиламина («ACROS ORGANICS», Бельгия, «Для ВЭЖХ»), 4,66 мл кислоты уксусной ледяной («ХИММЕД», Россия), pH = 6,0. Скорость потока – 1 мл/мин. Время удерживания фексофенадина составило 14,91±0,25 мин. Коэффициенты экстракции фексофенадина из плазмы крови крыс и гомогената коры головного мозга составили 83,57 и 81,25 %, соответственно. Пределы количественного определения и предел обнаружения фексофенадина в гомогенате мозга и плазме крови составили 43,70 и 35,27 нг/г и 14,49 и 11,68 нг/мл, соответственно.

Суммарное количество фексофенадина, попавшее в системный кровоток и в кору больших полушарий, оценивали по площади под кривой «концентрация фексофенадина (в плазме крови или ткани коры больших полушарий головного мозга)–время» ($AUC_{0-t(плазма)}$ или $AUC_{0-t(мозг)}$), которые рассчитывали по методу трапеции [5].

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «StatSoft Statistica 13.0» и LibreOffice Calc.

Характер распределения данных, полученных в ходе исследований, оценивали по критерию Шапиро–Уилка. В случае, если распределение данных было нормальным, использовался дисперсионный анализ (ANOVA); попарные сравнения выполняли по критерию Ньюмана–Кейлса. При распределении данных, отличном от нормального, был использован критерий Крускала–Уоллиса при несвязанных выборках. Попарные сравнения выполняли по критерию Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Полученные результаты заносились в таблицы и графики в виде среднего арифметического и стандартного отклонения при нормальном распределении данных либо в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей в случае отличного от нормального распределения данных.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Средняя концентрация фексофенадина в плазме крови крыс через 5 мин после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы составила 16,6± 5,8 мкг/мл, затем постепенно снижалась и достигала значения 1,0±0,4 мкг/мл к 60 мин исследования (рис. 1). Медиана концентрации фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга крыс через 5 мин после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы составила 264,00 (198,98; 471,35) нг/г ткани, достигала через 15 мин своего максимума – 344,77 (245,99; 432,36) нг/г и постепенно снижалась к 60 мин исследования до 172,16 (147,5; 192,28) нг/г (табл. 1).

Введение ЭМГПС существенно не влияло на концентрации фексофенадина в плазме крови крыс

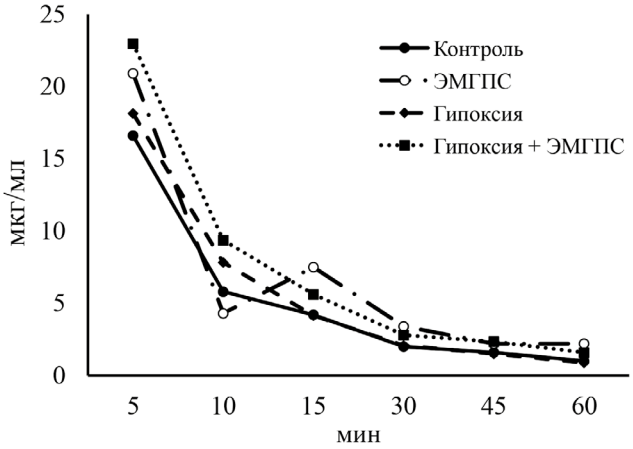


Рис. 1. Усреднённые фармакокинетические кривые фексофенадина в плазме крови крыс после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы на фоне внутривенного введения ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы, гипоксической гипоксии и их сочетания

Figure 1. Average pharmacokinetic curves of fexofenadine in the rats blood plasma after its intravenous administration at a dose of 10 mg/kg body weight after intravenous administration of EMHPS at a dose of 50 mg/kg body weight, hypoxic hypoxia and their combination

после его внутривенного введения во все временные точки и площадь под фармакокинетической кривой концентрация–время $AUC_{0\text{-}t(плазма)}$. Данные показатели статистически значимо не отличались от значений контрольных животных (см. рис. 1).

При этом введение тестируемого вещества вызывало повышение концентрации фексофенадина в коре больших полушарий через 45 мин после введения последнего на 109,4 % ($p = 0,07$) по сравнению с показателями контрольных крыс (см. табл. 1), а также

Таблица 1

Концентрация фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы на фоне внутривенного введения ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы, гипоксической гипоксии и их сочетания (медиана, верхний и нижний квартили, $n = 5$ на каждую временную точку)

Table 1

The concentration of fexofenadine in the rats cerebral cortex homogenate after its intravenous administration at a dose of 10 mg/kg body weight after intravenous administration of EMHPS at a dose of 50 mg/kg body weight, hypoxic hypoxia and their combination (median, upper and lower quartiles, $n = 5$ for each time point)

Группы эксперимента	Концентрация фексофенадина /Сроки эксперимента					
	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин
Контроль	264,00 (198,98; 471,35)	288,27 (202,98; 754,8)	344,77 (245,99; 432,36)	301,68 (120,85; 638,02)	242,91 (201,78; 385,01)	172,16 (147,5; 192,28)
ЭМГПС	799,3 (299,5; 1627,3)	849,4 (617,9; 928,9)	908,9 (264,5; 1236,4)	356,6 (201,9; 647,1)	508,7 (320,4; 1839,7)*$p = 0,07$	280,9 (146,9; 524,9)
Гипоксия	914,68 (834,97; 997,26)*	710,80 (614,81; 761,43)	690,76 (484,61; 799,71)	261,14 (246,97; 347,19)	698,89 (578,04; 778,46)*	380,3 (341,76; 434,64)*
Гипоксия + ЭМГПС	795,64 (723,61; 844,91)*	750,43 (628,07; 802,72)	633,95 (603,66; 699,49)*	780,72 (697,99; 825,93)* #	626,87 (492,29; 695,28)*	413,49 (322,32; 436,69)*

Примечание: * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями животных группы контроля.
Note: * – $p < 0,05$ – statistically significant differences with the indicators of the animals control group

увеличивало $AUC_{0–t(мозг)}$ фексофенадина на 125,0 % ($p < 0,05$) и отношения $AUC_{0–t(мозг)}$ / $AUC_{0–t(плазма)}$ на 24,2 % ($p = 0,06$) (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЭМГПС ингибирует активность белка-транспортёра Pgp в ГЭБ. Учитывая тот факт, что ингибирование выявлено при однократном введении препарата, снижение активности белка-транспортёра, скорее всего связано с непосредственным взаимодействием ЭМГПС с молекулой Pgp.

Ранее нами было показано, что ЭМГПС не является субстратом гликопротеина-Р, что позволяет признать гипотезу о субстратном ингибировании активности белка-транспортёра маловероятной [3]. С другой стороны, для лекарственных веществ дигидропиридинового ряда – никардипина, нимодипина, нитрендипина и нифедипина [6] было описано аллостерическое ингибирование Pgp. Поэтому логично предположить, что ингибирование Pgp под действием ЭМГПС осуществляется по аллостерическому типу.

Моделирование острой гипоксической гипобарической гипоксии приводило к следующим изменениям фармакокинетики маркерного субстрата Pgp – фексофенадина. Средняя концентрация фексофенадина в плазме крови крыс после его внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы на фоне гипоксического воздействия достоверно не отличалась от показателей контрольных животных во всех исследуемых временных точках ($p > 0,05$) (см. рис. 1).

В то же время концентрация фексофенадина в гомогенате коры мозга после гипоксического воздействия превосходила показатели контрольных животных через 5, 15, 45 и 60 мин после внутривенного введения на 246,5 % ($p = 0,008$); 100,4 % ($p = 0,063$); 187,7 % ($p = 0,01$) и 120,9 % ($p = 0,04$), соответственно (см. табл. 1). $AUC_{0–t(мозг)}$ и отношение $AUC_{0–t(мозг)}$ / $AUC_{0–t(плазма)}$ фексофенадина после гипоксического воздействия также превосходили значения группы контроля на 105,1 % ($p = 0,003$) и 47,1 % ($p = 0,027$), соответственно (см. табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о повышении проникновения фексофенадина в кору головного мозга крыс после моделирования острой гипоксической гипобарической гипоксии, что согласуется с данными литературы [7].

Превентивное внутривенное введение ЭМГПС перед гипоксическим воздействием приводило к следующим изменениям. Концентрация фексофенадина в плазме крови после его внутривенного введения на фоне гипоксии и тестируемого вещества превосходила значение контрольных животных только на 60 мин (на 59,0 %, $p = 0,018$), а в остальные сроки эксперимента достоверных различий между группами выявлено не было. При этом $AUC_{0–t(плазма)}$ фексофенадина после введения этилметилгидроксипиридина сукцината перед гипоксическим воздействием превышала аналогичный показатель контрольных животных на 60,8 % ($p = 0,011$) (см. табл. 2).

Концентрация фексофенадина в гомогенате коры мозга после гипоксического воздействия и введения ЭМГПС превосходила показатели контрольных животных через 5 мин на 201,4 % ($p = 0,008$), через 15 мин — на 83,9 % ($p = 0,016$), через 30 мин — на 158,8 % ($p = 0,01$), через 45 мин — на 158,1 % ($p = 0,01$), через 60 мин — на 140,2 % ($p = 0,004$). $AUC_{0–t(мозг)}$ фексофенадина после комбинированного воздействия также превосходила значения серии контроля на 127,6 % ($p = 0,003$), а отношение $AUC_{0–t(мозг)}$ / $AUC_{0–t(плазма)}$ – на 41,5 % ($p = 0,032$).

Таблица 2

Площадь под кривой «концентрация фексофенадина–время» $AUC_{0–t(плазма)}$, $AUC_{0–t(мозг)}$ и их отношение после внутривенного введения фексофенадина в дозе 10 мг/кг массы на фоне внутривенного введения ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы, гипоксической гипоксии и их сочетания (медиана, верхний и нижний квартили)

Table 2

The area under the curve «concentration of fexofenadine-time» $AUC_{0-t(plasma)}$, $AUC_{0-t(brain)}$ and their ratio after intravenous administration of fexofenadine at a dose of 10 mg/kg body weight after intravenous administration of EMHPS at a dose of 50 mg/kg body weight, hypoxic hypoxia and their combinations (median, upper and lower quartiles)

Группы эксперимента	$AUC_{0–t(плазма)}$	$AUC_{0–t(мозг)}$	Отношение $AUC_{0–t(мозг)}$ / $AUC_{0–t(плазма)}$
Контроль	173,7 (142,5; 266,2)	16,4 (15,5; 19,2)	0,09 (0,07; 0,11)
ЭМГПС	315,8 (201,6; 399,6)	36,9 (24,4; 51,8)*	0,11 (0,12; 0,13)*
Гипоксия	241,9 (234,9; 251,9)	33,6 (27,2; 36,4)*	0,14 (0,11; 0,15)*
Гипоксия + ЭМГПС	279,3 (264,4; 369,7)*	37,3 (35,2; 38,4)*	0,13 (0,1; 0,13)*

Примечание: * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями животных группы контроля; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.
Note: * – $p < 0,05$ – statistically significant differences with the indicators of the animals control group; EMHPS – ethylmethylhydroxypyridine succinate.

Полученные результаты свидетельствуют о повышении проникновения фексофенадина в кору головного мозга крыс после моделирования острой гипоксической гипобарической гипоксии и введения ЭПГПС.

При сравнении фармакокинетики фексофенадина у крыс, подвергнутых острой гипоксической гипобарической гипоксии, и крыс, получавших ЭМГПС перед гипоксическим воздействием, были получены следующие результаты. Концентрация фексофенадина в плазме крови экспериментальных животных во все временные точки достоверно между данными группами не различалась, только на 60 мин концентрация маркерного субстрата Pgp на фоне введения ЭМГПС превышала показатели крыс, подвергнутых изолированной гипоксии, на 78,7 % ($p = 0,016$). Не было выявлено достоверных различий и в значениях $AUC_{0\text{-}t(плазма)}$.

Концентрация фексофенадина в гомогенате коры головного мозга крыс после введения ЭМГПС и моделирования гипоксии превосходила значения серии изолированной гипоксии на 30 мин эксперимента на 198,9 % ($p = 0,008$), в остальные сроки эксперимента достоверно от них не отличалась. Также не было выявлено статистически значимых различий в значениях $AUC_{0–t(мозг)}$ и $AUC_{0–t(мозг)} / AUC_{0–t(плазма)}$ данных экспериментальных групп. Полученные результаты свидетельствуют о том, что однократное внутривенное профилактическое введение ЭМГПС перед гипоксическим воздействием существенно не влияет на проницаемость субстрата белка-транспортёра (она остаётся существенно выше контроля и не отличается от проницаемости ГЭБ при изолированном гипоксическом воздействии).

Заключение / Conclusion

Таким образом, в ходе исследования было показано, однократное внутривенное введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы вызывает снижение активности белка-транспортёра Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс. Моделирование острой гипоксической гипоксии сопровождается повышением проницаемости субстрата белка-транспортёра в ткань мозга. Однократное профилактическое введение ЭМГПС в дозе 50 мг/кг массы перед гипоксическим воздействием существенно не влияет на проницаемость субстрата белка-транспортёра – фексофенадина, которая остаётся существенно выше контроля и не отличается от проницаемости ГЭБ при изолированном гипоксическом воздействии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. Мыльников П.Ю. – выполнение хроматографических исследований, работа с лабораторными животными; Черных И.В. – работа с лабораторными животными; Щулькин А.В. – анализ полученных данных, написание статьи; Якушева Е.Н. – планирование работы, общее руководство работой, корректировка статьи.

Participation of authors. Mylnikov PYu – performing of chromatographic studies, working with laboratory animals; Chernykh IV – working with laboratory animals; Shchulkin AV – data analysis, article writing; Yakusheva EN – work planning, general management of the work, correction of the article.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мыльников Павел Юрьевич
e-mail: dukeviperlr@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7829-2494
SPIN-код: 8503-3082
ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

Mylnikov Pavel Yu.
e-mail: dukeviperlr@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7829-2494
SPIN code: 8503-3082
assistant of the Department of Pharmacology with the course of Pharmacy of the Faculty of Additional Professional Education, RyazSMU, Ryazan, Russia

Черных Иван Владимирович
e-mail: ivchernykh88@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-5618-7607
SPIN-код: 5238-6165
к.б.н., заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

Chernykh Ivan V.
e-mail: ivchernykh88@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-5618-7607
SPIN code: 5238-6165
PhD in Biology, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry RyazSMU, Ryazan, Russia

Щулькин Алексей Владимирович
Автор, ответственный за переписку
e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-1688-0017
SPIN-код: 2754-1702
д. м. н., доцент, профессор кафедры фармакологии с курсом фармации факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

Shchulkin Aleksey V.
Corresponding author
e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-1688-0017
SPIN code: 2754-1702
D. Sci. in Medicine, Associate Professor, Professor of the Department of Pharmacology with the course of Pharmacy of the Faculty of Additional Professional Education RyazSMU, Ryazan, Russia

Якушева Елена Николаевна
e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6887-4888
SPIN-код: 2865-3080
д. м. н., профессор, зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

Yakusheva Elena N.
e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-6887-4888
SPIN code: 2865-3080
D. Sci. in Medicine, Professor, Head of the Department of Pharmacology with the course of Pharmacy of the Faculty of Additional Professional Education RyazSMU, Ryazan, Russia

Литература / References

1. Воронина Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2012;112(12):86–90. [Voronina TA. Mexidol: the spectrum of pharmacological effects. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii*. 2012;112(12): 86–90. (In Russ).].

2. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Попова Н.М., Черных И.В., Титов Д.С. Структура, функции гликопротеина-Р и его значение для рациональной фармакотерапии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2014;12(2):3–11. [Yakusheva EN, Shulkin AV, Popova NM, Chernyh IV, Titov DS. Structure, functions of P-glycoprotein and its role in rational pharmacotherapy. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii*. 2014;12(2):3–11. (In Russ).].

3. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Черных И.В. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015;78(5):19–23. [Yakusheva EN, Shchul'kin AV, Chernykh IV. Assessment of the attribution of mexidol to P-glycoprotein substrates, inhibitors, or inductors. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2015;78(5):19–23. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2015-78-5-19-23.

4. Бобков Ю.Г., Иванова И.А. Методологические подходы к поиску фармакологических средств, эффективных при гипоксии и ишемии мозга. *Пат. физиол. и эксперим. терапия*. 1987;(6):13–19. [Bobkov YuG, Ivanova IA. Metodologicheskie podkhody k poisku farmakologicheskikh sredstv, effektivnykh pri gipoksii i ishemii mozga. *Pat. fiziol. i eksperim. terapiya*. 1987;(6):13–19. (In Russ).].

5. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика. – Ростов-на-Дону: Феникс; 2001. [Karkishchenko NN, Khoron'ko VV, Sergeeva SA, Karkishchenko VN. Farmakokinetika. Rostov-na-Donu: Feniks; 2001. (In Russ).].

6. Ferry DR, Russell MA, Cullen MH. P-glycoprotein possesses a 1,4-dihydropyridine selective drug acceptor site which is allosterically coupled to a vinca alkaloid selective binding site. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;188(1):440–445. DOI: 10.1016/0006-291x(92)92404-l.

7. Witt KA, Mark KS, Hom S, Davis TP. Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(6):H2820-31. DOI: 10.1152/ajpheart.00589.2003

Абсолютная биодоступность соединения, обладающего кардиопротективной активностью (АЛМ-802), у крыс

Колыванов Г. Б., Бочков П. О., Литвин А. А., Шевченко Р. В., Подолько А. Л., Жердев В. П.

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

Аннотация. На крысах изучена фармакокинетика нового потенциального кардиопротективного средства АЛМ-802 после однократного внутривенного и внутрижелудочного введения в дозах 10 и 100 мг/кг, соответственно. Абсолютная биодоступность составила 4,45 %, что говорит о потенциальной возможности разработки лекарственной формы для приёма внутрь.

Ключевые слова: кардиопротектор; АЛМ-802; доклиническая фармакокинетика; ВЭЖХ-масс-спектрометрия; абсолютная биодоступность

Для цитирования:
Колыванов Г. Б., Бочков П. О., Литвин А. А., Шевченко Р. В., Подолько А. Л., Жердев В. П. Абсолютная биодоступность соединения, обладающего кардиопротективной активностью (АЛМ-802), у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2021;(2):31–35. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-31-35
Поступила: 18 июля 2021 г. **Принята:** 13 августа 2021 г. **Опубликована:** 10 ноября 2021 г.

Absolute bioavailability of a substance with cardioprotective activity (ALM-802) in rats

Kolyvanov GB, Bochkov PO, Litvin AA, Shevchenko RV, Podolko AL, Zherdev VP

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The pharmacokinetics of a new potential cardioprotective agent ALM-802 was studied in rats after single intravenous and intragastric administration at doses of 10 and 100 mg/kg, respectively. The absolute bioavailability was 4.45 %, which indicates the potential for the development of a dosage form for oral administration.

Keywords: cardioprotector; ALM-802; preclinical pharmacokinetics; HPLC-mass spectrometry; absolute bioavailability

For citations:
Kolyvanov GB, Bochkov PO, Litvin AA, Shevchenko RV, Podolko AL, Zherdev VP. Absolute bioavailability of a substance with cardioprotective activity (ALM-802) in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2021;(2):31–35. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-31-35
Received: July 18, 2021. **Accepted:** August 13, 2021. **Published:** November 10, 2021

Введение / Introduction

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имена В.В. Закусова», в результате исследований в ряду α,ω-диарилметильных производных бис-(ω-аминоалкил) аминов было выявлено соединение N_1-(2,3,4-триметоксибензил)-N_2-{2-[(2,3,4-триметоксибензил) амино]этил}-1,2-этандиамина (в виде тригидрохлорида) с рабочим шифром АЛМ-802, которое по своей кардиопротективной активности, изученной на животных с интактным сосудистым руслом, как минимум, не уступает эталонному препарату триметазидину [1].

Цель данного исследования – методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) изучить фармакокинетику АЛМ-802 в плазме крови крыс после однократного внутривенного (в/в) и внутрижелудочного (в/ж) введения и определить его абсолютную биодоступность.

Методика исследования / Method of research

Исследование проведено на половозрелых беспородных крысах-самцах с массой тела 180–220 г. Животные содержались в лабораторном виварии при 20–22 °С, относительной влажности воздуха 45–65 %, имели свободный доступ к корму и воде. Эксперименты проводили в соответствии с решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Изучение фармакокинетики соединения АЛМ-802 в плазме крови крыс проводили после в/в введения раствора (в воде дистиллированной с добавлением 1 капли полисорбата (твина 80) фармацевтической субстанции в дозе 10 мг/кг. Также исследуемое вещество вводили в/ж с помощью зонда в виде суспензии в 1 % крахмальном клейстере в дозе 100 мг/кг. Для определения абсолютной биодоступности АЛМ-802 пробы крови отбирали до введения вещества (контроль) и через 0,08; 0,17; 0,34; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12 ч после в/в введения и при в/ж введении – контроль и через 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12 ч. Анализу подвергали надосадочную жидкость, полученную после добавления к аликвоте плазмы крови 3-кратного объёма ацетонитрила и последующего центрифугирования. Количественное определение соединения АЛМ-802 проводили с использованием метода тандемной ВЭЖХ с масс-спектрометрией. В работе использовали жидкостной хроматограф «Thermo Ultimate 3000» («Thermo Scientific», США). Детектор – масс-спектрометр «Thermo TSQ Altis» («Thermo Scientific», США) (тип «тройной квадруполь») с ионизацией электрораспылением. Регистрацию масс-спектров проводили в режиме множественных молекулярных

реакций по дочернему иону с отношением массы к заряду m/z = 181, полученному изолированием и фрагментацией нативного молекулярного иона с m/z = 464 (соответствует протонированному молекулярному иону соединения АЛМ-802), напряжение на электродах в коллизионной ячейке составляло 25 В. Напряжение на распылителе – 3500 В, температура интерфейса – 350 °С; температура ионного капилляра – 325 °С, параметры вспомогательных газов-распылителей задавались управляющей программой по умолчанию для потока 0,3 мл/мин.

Подвижная фаза состояла из компонента А (0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде ультрачистой) и Б (к 50 мл воды ультрачистой прибавляли 1 мл муравьиной кислоты, полученный раствор доводили ацетонитрилом в мерном цилиндре до объёма 1,0 л). Растворы А и Б смешивали в соотношении 25:75. Полученную фазу перед использованием дегазировали на ультразвуковой бане.

Анализ выполняли на колонке «Agilent SB-phenyl» («Agilent», США) 2,1×100 мм с размером частиц 1,8 мкм. Температура термостата – 40 °С. Объём вводимой пробы 1 мкл. В этих условиях время удерживания соединения АЛМ-802 составило 1,7 мин. Нижний предел количественного определения – 1 нг/мл.

Исследование биотрансформации АЛМ-802 проводили в плазме крови, полученной через 1 и 2 ч после в/ж введения исследуемого вещества в дозе 100 мг/кг, и суточной моче крыс в сравнении с образцами интактной плазмы крови и мочи крыс. В одну пробу добавляли β-глюкуронидазу (Sigma-Aldrich, США), в другую – фермент не добавляли. На 0,1 мл плазмы крови добавляли 0,01 мл фермента, на 0,1 мл мочи – равный объём β-глюкуронидазы. Пробы термостатировали на водяной бане при 37 °С в течение 1 ч. Далее проводили процедуру пробоподготовки. О наличии глюкуроноконъюгатов судили по изменению концентрации неизменённого соединения в образцах плазмы крови и мочи после обработки ферментом в сравнении с образцами, пробоподготовка которых не включала обработку β-глюкоронидазой.

На основании полученных концентраций АЛМ-802 в плазме крови крыс модельно-независимым методом рассчитывали его основные фармакокинетические параметры:

$AUC_{0\to\infty}$ (нг/мл×ч) – площадь под фармакокинетической кривой (площадь под кривой «концентрация аналита – время») после в/ж или в/в введения.

$AUC_{0\to\infty}$ рассчитывается от момента введения аналита до бесконечности;

C_{max} (нг/мл) – максимальная концентрация лекарственного вещества (ЛВ) в плазме крови после в/ж введения;

T_{max} (ч) – время достижения C_{max} после в/ж введения;

C_0 – кажущаяся C_{max} ЛВ в плазме крови после в/в введения;

Cl, Cl/F (л/ч/кг) – общий плазменный клиренс;

V_d, V_d/F (л/кг) – кажущийся объем распределения;

k_{el} ($ч^{-1}$) – константа скорости элиминации;

$t_{1/2el}$ (ч) – период полувыведения,

MRT (ч) – среднее время удерживания ЛВ в организме;

$f_{абс}$ – абсолютная биодоступность, которую рассчитывали по формуле:

$$f_{абс} = (AUC_{0\to\infty}\text{в/ж} \times Dв/в)/(AUC_{0\to\infty}\text{в/в} \times Dв/ж) \times 100\ \%,$$

где $AUC_{0\to\infty}$ в/ж – AUC после в/ж введения,

$AUC_{0\to\infty}$ в/в – AUC после в/в введения,

D в/в и D в/ж – доза соединения после в/в и в/ж введения, соответственно.

Результаты исследования / Results of the study

На рис. 1 представлены усреднённые фармакокинетические профили соединения АЛМ-802 в плазме крови крыс после однократного в/ж и в/в введения дозах 100 и 10 мг/кг, соответственно. Фармакокинетические параметры АЛМ-802 после различных путей введения представлены в табл. 1. Поскольку на каждую временную точку использовали по 5 животных, результирующая фармакокинетическая кривая была построена по усреднённым концентрациям, поэтому при расчётах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов.

Анализируемое вещество после в/ж введения определялось в плазме крови на протяжении 12 ч. Снижение концентраций после достижения максимального значения носит монофазный характер. Как видно из рисунка 1, соединение АЛМ-802 быстро всасывается из

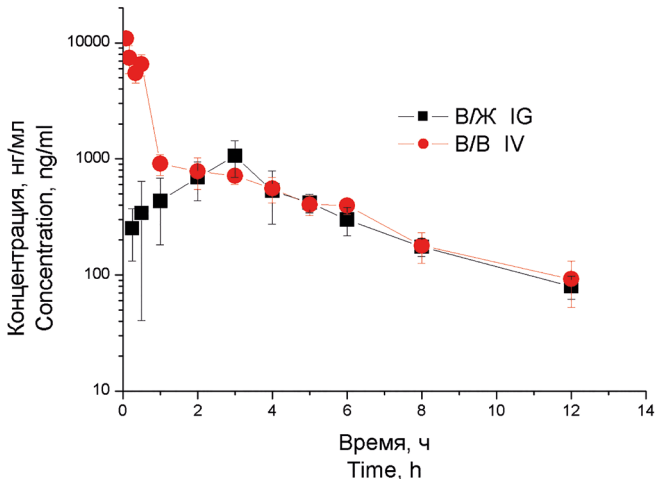


Рис. 1. Усреднённые фармакокинетические профили АЛМ-802 в плазме крови крыс после однократного внутрижелудочного (в/ж) и внутривенного (в/в) введения дозах 100 и 10 мг/кг (n = 5; M±m)

Figure 1. Average pharmacokinetic profiles of ALM-802 in rat blood plasma after a single intragastric (IG) and intravenous (IV) administration at doses of 100 and 10 mg/kg (n = 5; M±m)

Таблица 1

Фармакокинетические параметры АЛМ-802 в плазме крови крыс после однократного внутрижелудочного (в/ж) и внутривенного (в/в) введения субстанции АЛМ-802 в дозе 100 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно

Table 1

Pharmacokinetic parameters of ALM-802 in rat blood plasma after a single intragastric (IG) and intravenous (IV) administration of ALM-802 substance at a dose of 100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively

Параметр / Parameter	Единицы Измерения / Dimensions	Путь введения / Administration route	
		в/ж /IG	в/в /IV
C_0	нг/мл	–	15427,87
C_{max}	нг/мл	1064,79	–
T_{max}	ч	3,0	–
k_{el}	$ч^{-1}$	0,2705	0,2194
$AUC_{0\to\infty}$	нг/мл×ч	4648,86	10448,45
$t_{1/2el}$	ч	2,6	3,2
MRT	ч	4,9	4,6
Cl	л/ч/кг	–	0,957
Cl/F	л/ч/кг	21,511	–
V_d	л/кг	–	4,361
V_d/F	л/кг	79,52	–
$f_{абс}$	%	4,45	

ЖКТ в системный кровоток и определяется в плазме крови уже через 15 мин. Максимальная концентрация (C_{max}) АЛМ-802 в плазме крови (1064,79 нг/мл) достигалась через 3,0 ч (T_{max}) после введения (см. табл. 1). Соединение АЛМ-802 достаточно медленно выводится из организма животных. Об этом свидетельствуют значения следующих фармакокинетических параметров: период полувыведения ($t_{1/2el}$) исследуемого вещества составил 2,6 ч, а среднее время удерживания вещества в организме животных (MRT) – 4,9 ч.

Параметром, характеризующим степень проникновения ЛВ в ткани, является кажущийся объём распределения (V_d/F). Его величина для крыс составила 79,52 л/кг. Крайне высокое значение данного параметра указывает, что АЛМ-802 распределяется во всех жидких средах организма животных.

Фармакокинетика соединения АЛМ-802 после его в/в введения крысам существенно отличается от кинетики в/ж введения, прежде всего более высокими концентрациями неизменённого соединения (см. рис. 1). После в/в введения соединение АЛМ-802 так же как и в случае в/ж введения определяется в плазме крови на протяжении 12 ч. Из рис. 1 видно, что после в/в способа введения в плазме крови наблюдается двухфазное снижение концентраций исследуемого соединения. На протяжении первой фазы (с момента введения до 1 ч после введения) концентрация неизменённого соединения упала с 15 427,87 нг/мл (кажущаяся начальная концентрация – C_0, т. е. концентрация АЛМ-802 в момент введения) до 907,26±183,72 нг/мл, т.е. в 17 раз. Терминальная часть фармакокинетической кривой была аналогична таковой после в/ж введения. Об этом свидетельствуют значения констант скорости элиминации (k_{el}) (0,2194 и 0,2705 $ч^{-1}$, соответственно). Такие фармакокинетические параметры, как $t_{1/2el}$ равный 3,2 ч и MRT – 4,6 ч, указывают на относительно длительное нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных. Таким образом, полученные результаты по изучению фармакокинетики соединения АЛМ-802 позволяют заключить, что исследуемое ЛВ элиминирует из организма животных с невысокой скоростью и его можно отнести к группе «долгоживущих».

Абсолютная биодоступность ($f_{абс}$) соединения АЛМ-802 после в/ж введения составила 4,45 %. Невысокую абсолютную биодоступность АЛМ-802 можно объяснить тем, что после в/ж введения соединение подвергается эффекту «первого прохождения» через печень с образованием глюкуроноконъюгированных метаболитов. В то же время после в/в введения этот эффект выражен в меньшей степени, и в плазме крови, в основном, регистрируется исходное соединение. В пользу этого утверждения говорят результаты изучения биотрансформации триметазидина. АЛМ-802 можно рассматривать как структуру, содержащую в своей молекуле двойной 2,3,4-триметоксибензиловый фрагмент триметазидина (рис. 2):

Метаболизм триметазидина в плазме крови и моче человека подробно описан [2, 3]. Одно из направлений биотрансформации заключается в образовании метаболитов за счёт деметилирования метоксигруппы

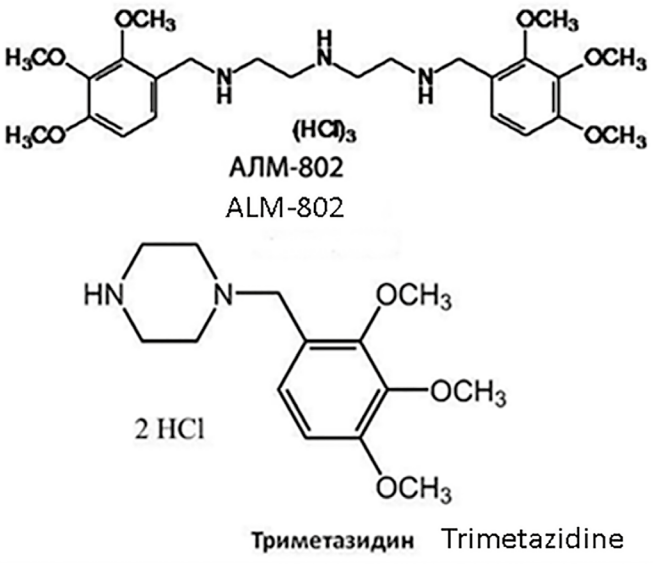


Рис. 2. Структурные формулы соединения АЛМ-802 и триметазидина
Figure 2. Structural formulas of ALM-802 and trimetazidine

2,3,4-триметоксибензиловой части молекулы триметазидина с последующей конъюгацией до *О*-глюкуронида и *О*-сульфата.

В тоже время нами были проведены исследования подтверждающие, что соединение АЛМ-802 после в/ж введения подвергается выраженному эффекту «первого прохождения» через печень с образованием глюкуроноконъюгированных метаболитов. Полученные результаты показали, что после обработки ферментом концентрация неизменённого соединения в образцах плазмы крови выросла на 26–63%. В то же время в образцах суточной мочи, не обработанных ферментом, соединение АЛМ-802 обнаружено не было. После добавления к этим пробам β-глюкуронидазы регистрировались высокие концентрации АЛМ-802.

В результате проведённого исследования необходимо отметить, что абсолютная биодоступность соединения АЛМ-802 после в/ж введения, составившая 4,45 % говорит о потенциальной возможности разработки лекарственной формы для приёма внутрь.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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

Kolyvanov Gennadiy B.
e-mail: 7822535@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2571-0047
SPIN code: 2538-8639
D. Sci. in Biology, Leading researcher of the laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Бочков Павел Олегович
e-mail: bok-of@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8555-5969
SPIN-код: 5576-8174
к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Bochkov Pavel O.
e-mail: bok-of@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8555-5969
SPIN code: 5576-8174
PhD in Biology, Senior Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

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

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

Шевченко Роман Владимирович
e-mail: rmn.shev@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4646-7733
SPIN-код: 1844-6202
к. м. н., н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Shevchenko Roman V.
e-mail: rmn.shev@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-4646-7733
SPIN code: 1844-6202
PhD in Medicine, Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Подолько Анна Леонидовна
e-mail: podolko.a.l@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2418-8055
SPIN-код: 4707-3068
м. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Жердев Владимир Павлович
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2710-7134
SPIN-код: 2213-9592
д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Podolko Anna L.
e-mail: podolko.a.l@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2418-8055
SPIN code: 4707-3068
Junior Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Zherdev Vladimir P.
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2710-7134
SPIN code: 2213-9592
D. Sci. in Medicine, professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. Скрининг кардиотропной активности в ряду α,ω-диарилметильных производных бис-(ω-аминоалкил)аминов. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2016;(2):10–13. [Kryzhanovskii SA, Likhosherstov AM, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Mokrov GV, Gudasheva TA. Screening of the compounds having cardiotropic activity among the α, ω-diarilmetil derivatives of bis-(ω-aminoalkyl)amines. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2016;(2):10–13. (In Russ).].

2. Jackson PJ, Brownsill RD, Taylor AR. Identification of trimetazidine metabolites in human urine and plasma. *Xenobiotica*. 1996;26(2):221–228. DOI: 10.3109/00498259609046702.

3. Jeoung MK, Kim KS, Kim CS, Kim NH. An HPLC Determination of Trimetazidine in Human Plasma Using Liquid-Liquid Extraction for Sample Clean-Up. *J Liq Chrom Relat Tech*. 2005;28(9):1299–1309. DOI: 10.1081/JLC-200054785

Фармакокинетика и нейротропные эффекты цикло-*L*-пролилглицина и его модифицированных аналогов

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

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

Аннотация. В обзоре представлены результаты исследований фармакокинетики, метаболизма, биодоступности для ЦНС и нейротропной активности нового дипептида цикло-*L*-пролилглицина (ЦПГ) и его модифицированных аналогов. Показано, что фармакологически активный метаболит ноотропного препарата ноопепт – цикло-*L*-пролилглицин является эндогенным дипептидом, представляет собой фрагмент концевого трипептида инсулиноподобного фактора роста нервов IGF-1. В настоящее время большое внимание уделяется разработке модифицированных аналогов ЦПГ, энзиматически более устойчивых, лучше проникающих через ГЭБ и высокоэффективных при использовании в микромолярных дозах. ЦПГ проявляет нейропротективную активность при ишемически-гипоксических и других повреждениях головного мозга, улучшает нарушенные когнитивные функции; кроме того, он обладает комплексом других фармакологических эффектов. В связи с вышеизложенным ЦПГ можно рассматривать не только, как потенциальное лекарственное средство, но и как базисную структуру для разработки новых нейротропных лекарственных средств – аналогов ЦПГ с улучшенными фармакокинетическими свойствами, большей энзиматической стабильностью и более высокой биодоступностью для ЦНС.

Ключевые слова: фармакокинетика; цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ) и его аналоги; энзиматическая стабильность; биодоступность для ЦНС; нейротропная активность

Для цитирования:
Бойко С. С., Жердев В. П., Колясникова К. Н. Фармакокинетика и нейротропные эффекты цикло-*L*-пролилглицина и его модифицированных аналогов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(2):36–41. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-36-41
Поступила: 18 июля 2021 г. **Принята:** 13 августа 2021 г. **Опубликована:** 10 ноября 2021 г..

Pharmacokinetics and neurotropic effects of cyclo-L-prolylglycine and its modified analogues

Boyko SS, Zherdev VP, Kolyasnikova KN

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The review presents the results of studies on the pharmacokinetics, metabolism, and bioavailability of new neurotropic dipeptide cyclo-*L*-prolilglycine (CPG) and their pharmacological activity. It was shown that the pharmacologically active metabolite of the nootropic drug noopept cyclo-*L*-prolilglycine (CPG) is an endogenous dipeptide, it is a fragment of the terminal Tripeptide of the insulin-like nerve growth factor IGF-1. Much attention is paid both in Russia and abroad to the development of modified CPG analogues with improved pharmacokinetic properties, enzymatically more stable, better penetrating the BBB, and highly effective when used in micromolar doses. CPG shows neuroprotective activity in ischemic-hypoxic and other brain injuries, in addition, it has a complex of other pharmacological effects and therefore CPG can be considered not only as a potential drug, but also as a basic structure for the development of new neurotropic drugs – analogs of CPG with improved pharmacokinetic properties, greater enzymatic resistance and higher bioavailability for the central nervous system.

Keywords: pharmacokinetics; dipeptide cyclo-*L*-prolylglycine (CPG) and its analogues; enzymatic stability; bioavailability for the Central nervous system; neurotropic effects

For citations:
Boyko SS, Zherdev VP, Kolyasnikova KN. Pharmacokinetics and neurotropic effects of cyclo-L-prolylglycine and its modified analogues. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(2):36–41. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-36-41
Received: July 18, 2021. **Accepted:** August 13, 2021. **Published:** November 10, 2021

Введение / Introduction

В настоящее время разработка нейротропных лекарственных средств для лечения нейропсихических заболеваний, сопровождающихся нарушением когнитивных функций вследствие ишемии, гипоксических повреждений головного мозга, инсультов, нарушения мозгового кровообращения, а также возрастных заболеваний, связанных с естественным старением организма и увеличением продолжительности жизни (болезнь Паркинсона, Альцгеймера и др.), является актуальной проблемой, которая разрабатывается длительное время в России и за рубежом. Особое внимание уделяется разработке модифицированных аналогов эндогенного дипептида цикло-*L*-пролилглицина, обладающего нейропротективным и ноотропным эффектами. В обзоре представлены основные данные литературы по разработке новых перспективных лекарственных средств (ЛС) — модифицированных аналогов ЦПГ, их фармакокинетике, проницаемости через ГЭБ и нейропротективной активности.

Разработка направления в России / Development of the project in Russia

Изучение фармакокинетики новых лекарственных препаратов особенно актуально для пептидных лекарственных средств из-за их энзиматической нестабильности и короткого периода полусуществования в неизменённом виде. В связи с этим наиболее перспективным направлением является разработка новых нейротропных лекарственных средств на основе коротких фрагментов природных нейропетидов из-за их большей энзиматической стабильности и лучшей биодоступности для ЦНС. Основными фармакокинетическими параметрами, наиболее значимыми для

нейротропных ЛС дипептидной структуры, являются период полувыведения и биодоступность для ЦНС. Период полувыведения – $T_{1/2}$ – время, в течение которого изучаемое соединение находится в организме в неизменённом виде позволяет оценить энзиматическую устойчивость изучаемого дипептида. Второй параметр – биодоступность для ЦНС ($F_{мозг/плазма}$) рассчитывается по соотношению площадей под фармакокинетическими кривыми «концентрация–время» мозг/плазма, даёт возможность оценить количество изучаемого соединения, поступившего в мозг. Эти параметры позволяют оценить перспективность разработки нового изучаемого дипептида как потенциального лекарственного средства.

Новый дипептид циклической структуры – цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ) был впервые обнаружен в мозге крыс при изучении фармакокинетики ноотропного препарата ноопепт, который представляет собой этиловый эфир *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицина, в качестве его активного метаболита; при этом было показано, что в мозге крыс он определяется в более высокой концентрации по сравнению с плазмой, имеет продолжительный период полувыведения [1, 2], что свидетельствует о его энзиматической устойчивости и высокой тропности к ткани мозга крыс. Кроме того, величина площади под фармакокинетической кривой в мозге была на 39 % выше по сравнению с аналогичным параметром в плазме крови крыс, что свидетельствует о хорошей абсорбции ЦПГ тканью мозга крыс, высокой тканевой биодоступности мозга к этому нейропептиду и о его возможном связывании с внутриклеточными структурами мозга этих животных. Затем ЦПГ был идентифицирован как эндогенное соединение в мозге экспериментальных животных, и определено его количественное содержание в мозге беспородных крыс, которое составило 2,8 нМ/1 г влажной массы мозга этих животных [3, 4]. Показана методами ГЖХ-ВЭЖХ-масс-спектрометрии идентичность метаболита ноопепта и эндогенного соединения циклической структуры дипептида ЦПГ [3, 4]. Кроме того, в работах зарубежных учёных показано эндогенное происхождение ЦПГ – он является продуктом метаболического превращения и циклизации концевого трипептида инсулиноподобного фактора роста нервов IGF-1 [5]. При изучении фармакологической активности ЦПГ было показано, что он обладает ноотропной [6], антигипоксической [7], анксиолитической [8], нейропротективной [9] и другими видами фармакологической активности [10]. Ноотропная активность ЦПГ была установлена в исследованиях с использованием методов УРАИ и УРПИ при системном введении дипептида в дозах 0,1–0,5 мкг/1 г [11], которая в меньшей степени проявлялась у плохо обучающихся животных в условиях ишемии головного мозга [12]. Было показано, что ЦПГ влияет на все стадии когнитивного процесса: введение информации, консолидации, хранения и воспроизведения памятного следа, что сближает его с пирацетамом, в отличие от ноопепта, который влияет на начальные фазы памяти – формирования и накопления информации [11]. Выраженность ноотропного эффекта ЦПГ связана с его высокой биодоступностью к ткани мозга крыс, поэтому нельзя исключить возможность непосредственного влияния ЦПГ на внутриклеточные структуры головного мозга, принимающие участие в реализации его ноотропного эффекта. В ранее проведённом изучении структурной и внутриклеточной локализации ЦПГ в мозге экспериментальных животных было установлено, что в большей концентрации он определяется в нейрональной фракции коры и гипоталамуса головного мозга [13] – структурах, принимающих участие в реализации ноотропного и анксиолитического эффектов ЛС. Аналогичная локализация и внутриклеточное распределение известно и для других дипептидных ЛС [14, 15]. Нами получены экспериментальные данные, которые свидетельствуют об участии ЦПГ в проявлении других нейротропных эффектов. Так, было показано, что ЦПГ обладает выраженным антигипоксическим и анксиолитическим эффектами у беспородных крыс при его системном введении в дозах 0,5–1,0 мг/кг [16, 17]. Кроме того, при изучении этих эффектов ЦПГ у инбредных животных 2 линий была впервые показана зависимость выраженности этих эффектов от содержания ЦПГ в мозге животных разного фенотипа [17]. Так, у животных линии Balb/c содержание ЦПГ в мозге было на 39 % меньше, чем в мозге стресс-устойчивой линии Blac/57; дефицит ЦПГ приводит к меньшей стресс-устойчивости и большей степени выраженности у этих животных анксиолитического эффекта. Полученные данные указывают на возможность непосредственного участия ЦПГ в реализации анксиолитического и антигипоксического эффектов, интенсивность проявления которых связана с фенотипом мышей и с различным содержанием ЦПГ в мозге этих животных [16, 17]. Дефицит ЦПГ у стресс-неустойчивых животных линии BALB/c, возможно, приводит к изменению их поведения, нарушению когнитивных функций и реакций на гипоксию и другие внешние воздействия, а также введение лекарственных средств и фармацевтических препаратов. В то же время нельзя исключить влияние ЦПГ на рецепторные системы, связанные с проявлением изучаемых эффектов этого дипептида. Показано, что ЦПГ обладает выраженным нейропротективным действием, что является актуальным направлением психофармакологии, и отвечает потребностям современной медицины в нейропротективных лекарственных средствах с сопутствующим ноотропным эффектом. Нейропротективный эффект ЦПГ изучен нами в опытах *in vitro* и *in vivo*. В экспериментах *in vitro* с использованием клеточных структур ткани мозга показано, что ЦПГ проявляет нейропротективный эффект в концентрациях 10^{-5}–10^{-8} М в условиях глютаматной эксайтотоксичности при его введении за 24 часа до воздействия глютаматом; при дальнейшем увеличении дозы ЦПГ нейропротективный эффект не только не возрастает, но даже, напротив, несколько снижается. В этих условиях эксперимента восстанавливается жиз-

неспособность от 30–70 % нервных клеток. Аналогичные результаты были получены и при использовании в качестве повреждающего агента 6-гидроксидофамина [8]. Тот факт, что нейропротективный эффект ЦПГ проявляется за 24 часа до воздействия нейротоксинами, вероятно, связан со сложным механизмом его действия и его влиянием на рецепторные структуры, принимающие участие в реализации его нейропротективного эффекта, а также его влиянием на биосинтез белка повреждённых нейронов «*de novo*» [8]. Нейропротективный эффект ЦПГ показан *in vivo* в условиях неполной глобальной церебральной ишемии головного мозга при системном введении ЦПГ, который полностью восстанавливает двигательную активность, снижает выраженность неврологических нарушений у животных с ишемией и восстанавливает жизнеспособность нервных клеток коры, гиппокампа и стриатума головного мозга экспериментальных животных [9]. В настоящее время появились данные литературы, указывающие на наличие у ЦПГ антидепрессивной активности. С использованием метода рецепторного связывания показано влияние ЦПГ на ГАМК-, глютамат-ергические рецепторы, систему BDNF, оборот катехоламинов (как норадреналина, так и серотонина) в разных структурах головного мозга, при этом показано, что влияние ЦПГ, в большей степени выражено у мышей линии BALB/c с пониженным содержанием эндогенного ЦПГ в мозге животных этой линии [18–20] .

Разработка аналогов на основе ЦПГ / Development of analogs associated CPG

Учитывая полученные результаты изучения фармакокинетики ЦПГ, его высокой биодоступности для ЦНС, энзиматической устойчивости и его фармакологической активности, этот дипептид можно рассматривать не только как перспективное ЛС, но и как базисную структуру для создания его модифицированных потенциально активных аналогов. В связи с этим было перспективным на его основе создание выполняющих роль пролекарств менее полярных аналогов, энзиматически более устойчивых и биодоступных для ЦНС, способных лучше проникать через ГЭБ с последующим метаболическим превращением в ЦПГ. Поиск средств с нейротропной активностью на основе ЦПГ, как базисной структуры, проводился в отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по 2 направлениям: первое – поиск циклических аналогов ЦПГ за счёт расширения пирролидинового цикла и сужения пиперазинового цикла молекулы ЦПГ. По этому направлению не было найдено перспективных соединений, превосходящих ЦПГ по спектру нейротропной активности, и сочетающих весь спектр фармакологических эффектов, свойственных ЦПГ, и только один из циклических аналогов – бензиловый эфир цикло-*L*-пролил-аспарагиновой кислоты по спектру нейротропных эффектов подобен ЦПГ [10]. Второе направление разрабатывалось на основе ЦПГ, в результате которого был синтезирован ряд линейных аналогов ЦПГ с разными заместителями по С- и N- концам глипролинового фрагмента, из которого отобран по фармакологической активности и метаболизму замещённый дипептид – этиловый эфир *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролин (ГЗК-111). По структуре он близок к ноопепту и отличается только последовательностью аминокислот. Исходя из этого, было сделано предположение, которое получило затем экспериментальное подтверждение о возможной трансформации молекулы ГЗК-111 в ЦПГ. Результаты изучения метаболизма ГЗК-111 в опытах *in vitro* показали, что при его инкубации с плазмой крови и мозгом крыс дипептид активно метаболизируется, в результате отщепления фенилацетильной группы превращается в ЦПГ, причём, в большей степени этот процесс выражен при инкубации с мозгом крыс [21]. Результаты изучения фармакологической активности ГЗК-111 показали наличие всех нейротропных эффектов у этого дипептида, свойственных ЦПГ, при введении меньшей дозы модифицированного аналога дипептида [10]. Полученные данные о метаболизме ГЗК-111, его нейротропном эффекте свидетельствуют о перспективности его дальнейшего фармакологического изучения и создания на его основе фармацевтического препарата с нейропротективым эффектом для терапии различных патологий головного мозга.

Разработка проблемы за рубежом / Development of the problem abroad

В настоящее время опубликованы результаты исследований фармакокинетики и биологической активности новых модифицированных аналогов ЦПГ – фармакологически активного фрагмента инсулиноподобного фактора роста нервов (IGF-1) с нейропротективной активностью, которые проводятся за рубежом. Большое внимание разработке этого направления исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов уделяется коллективом учёных Университета из Новой Зеландии, целью которых было изучение аналогов фрагментов инсулиноподобного фактора роста нервов-1 (IGF-1) и создание на их основе фармацевтических препаратов с нейропротективным действием для лечения неврологических заболеваний. Сам IGF-1 обладает нейропротективным эффектом и улучшает нарушенные функции мозга после гипоксически-ишемического и других его повреждений [22]. Нейропротективный эффект проявляется у крыс через 2 ч после гипоксического повреждения мозга, и через 6 ч после поражения мозга этот эффект не обнаруживается, что связано с элиминацией пептида из ткани мозга, а также указывает на возможность его связывания с белками и другими клеточными структурами мозга. Однако в связи с плохим проникание через ГЭБ, большой молекулярной массой и митогенетическим потенциалом клиническое применение IGF-1 при

неврологических нарушениях ограничено [5, 22], для достижения терапевтического эффекта возможна только его внутрисосудистая инфузия. В этой связи более актуальным является разработка его аналогов с меньшей молекулярной массой и лучшей биодоступностью для ЦНС. Его аналог трипептид глицилпролилглютамат образуется из *N*-терминального конца IGF-1, однако он энзиматически нестабилен, его период полусуществования составляет от 2 до 4 мин после однократного болюсного и внутриперитонеального введения, соответственно, у крыс, вследствие этого возможна только его внутривенная инфузия для получения стабильного и выраженного нейропротективного эффекта [5, 22]. В то же время был установлен более продолжительный период полужизни этого трипептида в спинномозговой жидкости (СМЖ) и ткани мозга – более 30 мин по сравнению с плазмой (2–4 мин), что, по-видимому, можно объяснить меньшей протеазной активностью в ЦНС по сравнению с плазмой крови [22, 23]. Экспериментально доказано, что из этого трипептида в результате его энзиматического расщепления с последующей циклизацией может образовываться циклический дипептид глицилпролин, который значительно превосходит предшественника по энзиматической устойчивости и более высокой биодоступности для ЦНС [24]. Дальнейшее модифицирование структуры было целью увеличения его липофильности для лучшей проницаемости в мозг при минимальном увеличении молекулярной массы. Были синтезированы два аналога. Аналог с метильной группой имеет более продолжительный период полувыведения, составляющий 49 и 74 мин в плазме и мозге крыс, соответственно, лучше проникает через ГЭБ и проявляет более выраженный нейропротективный эффект при повреждении мозга [25]. В последующем для улучшения биодоступности был разработан модифицированный аналог с аллильной группой – цикло-*L*-глицил-*L*-2-аллилпролин (NNZ-2591). Он ещё более стабилен и лучше преодолевает ГЭБ независимо от гипоксически-ишемического повреждения мозга. Его уровень сохранялся в СМЖ в течение 2 ч после однократного подкожного введения и определялся на протяжении 6 ч после введения. Фармакокинетические параметры и продолжительный нейропротективный эффект предполагают его использование для лечения ишемических повреждений мозга и других неврологических нарушений [25]. Введение аллильного заместителя увеличивает липофильность молекулы, улучшает проницаемость через ГЭБ и его проникновение в СМЖ. Оба дипептида как цикло-глицилпролин, так и его аналог NNZ-2591 обладают нейропротективным действием после ишемического повреждения головного мозга, однако при этом NNZ-2591 энзиматически более устойчив и лучше проникает в ЦНС [25]. В связи с лучшим проникание в мозг этого дипептида, авторы рассматривают его как прекурсор и не исключают возможности энзиматического превращения NNZ-2591 в ЦПГ после его проникания в мозг. Установлена эффективность соединения NNZ-2591 у крыс в экспериментальной модели болезни Паркинсона при проведении доклинических исследований, его низкая токсичность и отсутствие побочных эффектов, в связи с чем планируется проведение клинических испытаний будущего препарата для лечения пациентов с болезнью Паркинсона и Альцгеймера.

Заключение / Conclusion

В обзоре представлены результаты экспериментальных исследований фармакокинетики, биодоступности для ЦНС и фармакологической активности нейропептида ЦПГ и его аналогов, показаны их преимущества с позиций фармакокинетики: их энзиматическая устойчивость и высокая биодоступность для ткани мозга, что способствует лучшему проявлению их нейропротективной активности. Результаты исследований фармакокинетики позволят оптимизировать клиническое применение новых фармацевтических препаратов с нейропротективной активностью с целью достижения максимального терапевтического эффекта. В связи с вышеизложенным перспективным являются исследования по разработке нейротропных аналогов ЦПГ и созданию на их основе новых фармацевтических препаратов с нейропротективным и сопутствующим ноотропным эффектом для лечения и восстановления функций ЦНС при гипоксически-ишемических и других повреждениях головного мозга, а также естественных процессов старения и заболеваний, связанных с увеличением продолжительности жизни.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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

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

Жердев Владимир Павлович
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2710-7134
SPIN-код: 2213-9592
д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Zherdev Vladimir P.
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0003-2710-7134
SPIN code: 2213-9592
D. Sci. in Medicine, professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

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

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

Литература / References

1. Бойко С.С., Жердев В.П., Гудашева Т.А., Островская Р.У. и др. Фармакокинетика дипептидного аналога пирацетама с нотропной активностью ГВС-111 и его основных метаболитов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 1997;72(2):3-6. [Boyko SS, Zherdev VP, Gudasheva TA, Ostrovskaya RU et al. Pharmacokinetics of dipeptide analog pyracetame wich nootropic activity GWS-111 and its main metabolites. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 1997;72(2):3–6. (In Russ).].

2. Бойко С.С., Жердев В.П., Коротков С.А., и др. Фармакокинетика нового потенциального дипептидного ноотропного препарата ГВС-111 и его метаболитов в мозге крыс. *Химико-фармацевтический журнал*. 2001;35(9):11–13. [Boyko SS, Zherdev VP, Gudasheva TA et al. Pharmacokinetics of new potencial dipeptide nootrope GWS-111 and its main metabolites in rat brain. Khimico-Farmatsevicheskii Zhurnal. 2001;35(9):11–13. (In Russ).]. doi: 10.1023/A^10140824082406443.

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

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

5. J Guan. Insulin-Like Growth Factor-1 and its Derivatives Potential Pharmaceutical Application for Ischemic Brain Injury. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2008;3(2):112–117. DOI: 10.2174/157488908784534630.

6. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С. и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирацетаму по селективности мнемотропного эффекта. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1999;128(10):411–413. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS et al. New endogenous dipetide cycloprolylglicine is similar to piracetam by its mnemotropic selectivity. Bulletin of experimental biology and medicine. 1999; 128(10):411–413. (In Russ).].

7. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова П.Н. и др. Сходство цикло-пролилглицина с пирацетамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2012;75(9):3–6. [Kolyasnicova KN, Gudasheva TA, Nasarova GA et al. Similarity of cycloprolylglycine to piracetam in antigypoxic and neuroprotective effects. Experimental and Clinical Pharmacology. 2012;75(9):3–6. (In Russ.).] DOI: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-3-6.

8. Николаев С.А., Логвинов И.О., Антипов П.И., Колясникова К.Н., Антипова Т.А. Нейропротектиное действие цикло-*L*-пролилглицина на моделях повреждения нейрональных клеток *in vitro*. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2017;(3):26–29. [Nikolaev SV, Logvinov IO, Antipov PI, Kolyasnikova KN, Antipova TA. Neuroprotective effect of *L*-cycloprolylglycine on models neuronal cells damage *in vitro*. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2017;(3):26–29. (In Russ).].

9. Поварнина П.Ю., Колясникова К.Н., Николаев С.В. и др. Нейропептид циклопролилглицин проявляет нейропротективную активность при системном введении на модели неполной глобальной ишемии у крыс в условиях глютаматной нейротксичности *in vitro*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015;160(11):600–603. [Povarnina PYu, Kolyasnikova KN, Nikolaev SV et al. The neuropeptide cycloprolylglycine exhibits neuroprotective activity when administered systemically on a model of incomplete global ischemia in rats under conditions of glutamate neurotoxicity *in vitro*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015;160(11):600–603. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-016-3241-5.

10. Колясникова К.Н. Изучение нейрохмических мехнизмов циклопролилглицина и создание на его основе новых нейротропных лекарственных средств. Автореферат диссертации канд. биол. наук. – Москва; 2018. [Kolyasnikova KN. Izuchenie nejrohmicheskih mekhnizmov ciklprolilglicina i sozdanie na ego osnove novyh nejrotropnyh lekarstvennyh sredstv. [dissertation] Moscow; 2018.

11. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. Оригинальный ноотропный и нейропротективный препарат ноопепт. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;65(5):66–72. [Ostrovskaya RU, Gudasheva TA, Voronina TA, Seredenin SB. The novel nootropic and neuroprotector drug noopept (GVS-111). *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2002;65(5):66–72. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092- 2002-65-5-66-7211.

12. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. Москва: Медицина; 2001. [Gusev EI, Skvortsova VI. Ischemia of the brain. Moscow: Medizina; 2001. (In Russ).]

13. Бойко С.С., Гудашева Т.А., Вичужанин М.В., Жердев В.П., Середенин С.Б. Региональная и субклеточная локализация циклопролилглицина в мозге крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010;149(6):648–650. [Boiko SS, Gudasheva TA, Vichuzhanin MV, Zherdev VP, Seredenin SB. Regional and subcellular localization of cycloprolylglycine in the rat brain. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010;149(6):648–650. (In Russ).].

14. Prasad CH, Mori M, Pierson W, et al. Development changes in the distribution of rat brain pyroglutamate aminopeptidase, a possible determinant of endogenous cyclo (HIS-PRO) concentrations. *Neurocheml Res*. 1983;8(3):389–399. DOI: 10.1007/BF00965728.

15. Prasad CH. Bioactive Cyclic Dipeptides. *Peptides*. 1995;16(1):151–164. DOI: 10.1016/0196-9781(94)00017-z.

16. Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Бойко С.С., Ковалев Г.И., и др. Эндогенный дипептид циклопролилглицин проявляет селективную анксиолитическую активность у животных с выраженной реакцией страха. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2002;133(4):417–419. [Seredenin SB, Gudasheva TA, Boyko SS, Kovalyov GI, et al. Endogenous dipeptide cycloproliglicine shows selestivnuyu anksioliticescuyu activity in animals with a pronounced fear reaction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2002;133(4):417–419. (In Russ).].

17. Жердев В.П., Бойко С.С., Колясникова К.Н. Взаимосвязь между содержанием психофармакологического средства циклопролилглицина и его антигипоксическим эффектом. *Фармакокинетика и*

фармакодинамика. 2020;(1):25–29. [Zherdev VP, Boyko SS, Kolyasnikova KN. The relationship between the content of the potential psychopharmacological agent cyclo-*L*-prolylglycine in the brain of experimental animals and its antihypoxic effect. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):25–29. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-25-29/

18. Шаронова И.Н., Букалова Ю.В., Гудашева Т.А., Скребицкий В.Г. Влияние эндогенного нейропептида циклопролилглицина на ГАМКА-рецепторы клеток Пуркинье мозжечка. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;167(1):42–45. [Sharonova IN, Bukalova YuV, Gudasheva TA, Skrebitsky VG. Effect of the endogenous neuropeptide cycloprolylglycine on GABA receptors of cerebellar Purkinje cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019;167(1):42–45. (In Russ).]

19. Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., и др. Антидепрессивноподобная активность аналогов циклопролилглицина и участие серотониновых, глутаматных и ГАМК-рецепторов в механизме её реализации. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2019;82(6):8–15. [Abdullina AA, Vasil'eva EV, Kondrakhin EA et al. Antidepressant-Like Effects of Cycloprolylglycine Analogs and the Involvement of Serotonin-, Glutamate-, and GABA-Receptors in Their Mechanisms. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2019;82(6):8–15. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-6-8-15.

20. Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Ковалёв Г.И. Влияние циклопролилглицина и его аналогов на моноаминергические системы мозга мышей BALB/c. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2020;(1):3-10. [Abdullina AA, Vasileva EV, Kudrin VS, Narkevich VB, Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kovalev GI. The effects of cycloprolylglycine and its analogues on brain monoaminergic systems in BALB/c mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):3–10. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-3-10.

21. Гудашева Т.А., Колясникова Н.Н., Кузнецова Е.А., Литвинова С.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Этиловый эфир *N*- фенилацетил-глицил-*L*-пролина метаболизируется до цикло-*L*-пролилглицина, проявляя сходный спектр нейропсихотропной активности. *Химико-фармацевтический журнал*. 2016;50(11):3–8. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kuznetsova EA, Litvinova SA, Zolotov NN, Voronina TA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. N-phenylacetyl-glycyl-*L*-proline ethyl ester converts into cyclo-L-prolyl-glycine showing a similar spectrum of neuropsychotropic activity. *Chemical and pharmaceutical journal*. 2016;50(11):3–8. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-11-3-8.

22. Bacthelor DC, Lin H, Wen J-Y, Keven C, Van Zijl PL, Breier BH, Gluckman PD, Thomas GB. Pharmacokinetics of glycine-proline-glutamate, the *N*-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-1, in rats. *Anal Biochem*. 2003; 323(2):156–163. DOI: 10.1016/j.ab.2003.08.032.

23. Bickerdike MJ, Thomas GB, Batchelor DC, Sirimanne ES, Leong W, Lin H, Sieg F, Wen J, Brimble MA, Harris PW, Gluckman PD. NNZ-2566: a Gly-Pro-Glu analogue with neuroprotective efficacy in a rat model of acute focal stroke. *J Neurol Sci*. 2009;278(1-2):85–90. DOI: 10.1016/j.jns.2008.12.003.

24. Singh-Mallah G , Singh K, McMahon ChD, Harris P, Brimble MA, Thorstensen E, Guan J. Maternally Administered Cyclic Glycine-Proline increases insulin-like Growth Factor-1 Bioavailability and Novelty Recognition in Developing Offspring. *Endocrinology*. 2016;157(8):3130–3139. DOI: 10.1210/en.2016-1189.

25. Guan J, Mathai S, Harris P, Wen J-Y, Zhang R, Brimble M, Gluckman P. Peripheral administration of a novel diketopiperazine, NNZ 2591 prevents brain injury and improves somatosensory-motor function following hypoxia-ischemia in adult rats. *Neuropharmacology*. 2007;53(6):749–762. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2007.08.010.

Сравнительный хемореактомный анализ орнитина аспартата, S-адеметионина и урсодезоксихолевой кислоты

Торшин И. Ю., Громова О. А.

ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» РАН» (ФИЦ ИУ РАН), Москва, Россия

Аннотация. *Цель исследования*. Фармакологические эффекты орнитина обусловлены, прежде всего, участием в нейтрализации аммиака и в метаболизме аминокислот. Для уточнения механизмов действия орнитина был проведён хемореактомный анализ орнитина аспартата в сравнении с S-адеметионином (S-AM) и урсодезоксихолевой кислотой (УДХК). *Методы.* Были оценены воздействия исследованных веществ на обмен уратов (производных мочевой кислоты), вазоактивность, структуру сосудов и на цитопротекцию методом хемореактомного анализа. *Результаты*. Установлено, что снижение уровней уратов в крови связано с ингибированием орнитином уратного транспортёра URAT1 (орнитин – IC_{50} = 65 нМ, S-AM – 1060 нМ, УДХК – 94 нМ) и ксантиноксидазы (орнитин – IC_{50} = 910 нМ, остальные молекулы IC_{50} = 9655–11040 нМ). Среди исследованных молекул орнитин отличался наиболее выраженными вазодилаторными свойствами (связанными, вероятно, с ингибированием адренорецепторов: Kd = 35 нМ, другие молекулы – 1108–1428 нМ). Наибольшая антидислипидемическая активность была показана также для орнитина (9,4 %) и S-AM (10,2 %), наименьшая – для УДХК (4,6 %). Антидислипидемический эффект орнитина связан с ингибированием эндотелиальной липазы (IC_{50} = 258 нМ для орнитина). Цитопротекторные эффекты орнитина ассоциированы с усилением синтеза глутатиона, снижением глутаматергической активности нейронов в условиях глутаматного стресса, ингибированием простагландин D-синтазы и снижением интенсивности острого лимфоцитарного воспаления без иммуносупрессии. *Вывод.* Таким образом, результаты хемореактомного анализа орнитина указывают на существенное расширение спектра фармакологических эффектов орнитина, включающий не только гепатопроекцию, но и кардиопротекцию и нефропротекцию.

Ключевые слова: орнитина аспартат; урсодезоксихолевая кислота; S-адеметионин; фармакология; гепатопротекция; хеморектомный анализ; Гепа-Мерц

Для цитирования:
Торшин И. Ю., Громова О. А. Сравнительный хемореактомный анализ орнитина аспартата, S-адеметионина и урсодезоксихолевой кислоты. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2021;(2):42–48. https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-42-48
Поступила: 20 октября 2021 г. **Принята:** 29 октября 2021 г. **Опубликована:** 10 ноября 2021 г.

Comparative chemoreactomic analysis of ornithine aspartate, S-ademethionine and ursodeoxycholic acid

Torshin IYu, Gromova OA

Federal Research Center "Computer Science and Control" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. *Purpose of the study.* The pharmacological effects of ornithine are primarily due to its participation in the neutralization of ammonia and in the metabolism of amino acids. To clarify the mechanisms of action of ornithine, a chemoreactom analysis of ornithine aspartate was performed in comparison with S-ademetionine (S-AM) and ursodeoxycholic acid (UDCA). *Methods.* The effects of the investigated substances on the metabolism of urates (derivatives of uric acid), vasoactivity, vascular structure and cytoprotection were assessed by the method of chemoreactome analysis. *Results.* It was found that a decrease in blood urate levels is associated with inhibition by ornithine of the urate transporter URAT1 (ornithine – IC_{50} = 65 nM, S-AM – 1060 nM, UDCA – 94 nM) and xanthine oxidase (ornithine – IC_{50} = 910 nM, other molecules IC_{50} = 9655-11040 nM). Among the studied molecules, ornithine was distinguished by the most pronounced vasodilatory properties (probably associated with inhibition of adrenergic receptors: Kd = 35 nM, other molecules – 1108-1428 nM). The highest antidyslipidemic activity was also shown for ornithine (9.4 %) and S-AM (10.2 %), the lowest for UDCA (4.6 %). The antidyslipidemic effect of ornithine is associated with inhibition of endothelial lipase (IC_{50} = 258 nM for ornithine). The cytoprotective effects of ornithine are associated with an increase in glutathione synthesis, a decrease in the glutamatergic activity of neurons under conditions of glutamate stress, inhibition of prostaglandin D-synthase, and a decrease in the intensity of acute lymphocytic inflammation without immunosuppression. *Conclusion.* Thus, the results of the ornithine chemoreactom analysis indicate a significant expansion of the spectrum of the pharmacological effects of ornithine, including not only hepatoprotection, but also cardioprotection and nephroprotection.

Keywords: ornithine aspartate; ursodeoxycholic acid; S-ademetionine; pharmacology; hepatoprotection; chemoreactome analysis; HepaMertz

For citations:
Torshin IYu, Gromova OA. Comparative chemoreactomic analysis of ornithine aspartate, S-ademethionine and ursodeoxycholic acid. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(2):42–48. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-42-48
Received: October 20, 2021. **Accepted:** October 29, 2021. **Published:** November 10, 2021

Введение / Introduction

L-орнитин (далее, орнитин) является промежуточным продуктом биосинтеза аргинина. Систематический компьютерный анализ исследований орнитина показал, что фармакологические эффекты орнитина обусловлены его участием в нейтрализации избытка аммиака в цикле мочевины, в метаболизме аминокислот, внутриклеточном синтезе белка, снижении воспаления и в поддержке Т-клеточного иммунитета [1].

Участвуя в цикле мочевины, орнитин регулирует метаболизм аминокислот (аргинина, глицина, гомоцистеина, бета-аланина, селеноцистеина) и биосинтез белка. Нарушения обмена аминокислот ассоциированы с патологией печени и других органов (печёночная энцефалопатия, саркопения, аноксия, острая травма лёгких, мочекаменная болезнь и др.). Орнитин поддерживает гормональный баланс, способствуя выработке инсулина и соматотропного гормона [1].

Хемомикробиомный анализ молекулы орнитина (действующее вещество препарата Гепа-Мерц) показал, что орнитин в меньшей степени, чем молекулы сравнения, стимулирует рост патогенных бактерий родов *Aspergillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* и грибов *Candida*. Стимулируя микроорганизмы-продуценты масляной и других короткоцепочечных жирных кислот, орнитин может проявлять и гастропротекторные свойства [2].

Таким образом, фармакологические эффекты орнитина обусловлены его участием в нейтрализации аммиака в цикле мочевины, метаболизме аминокислот, внутриклеточном синтезе белка и воспалении. Для уточнения механизмов действия орнитина был проведён хемореактомный анализ орнитина аспартата в сравнении с S-адеметионином (S-AM) и урсодезоксихолевой кислотой (УДХК). Хемореактомный анализ основан на хемоинформационном подходе в теории анализа размеченных графов [3], теории метрического анализа данных [4], комбинаторной теории разрешимости [5, 6], топологической теории анализа плохо-формализованных задач [7] и новейших методах прогнозирования значений числовых переменных [8].

Материалы и методы / Materials and methods

В настоящей работе был проведён хемореактомный анализ молекулы орнитина в сравнении со структурами S-адеметионина и урсодезоксихолевой кислоты (рис. 1). Анализ дополнительных фармакологических «возможностей» молекул был проведён на основе хемоинформационного подхода, т. е. сравнения химической структуры исследуемых молекул со структурами миллионов других молекул, для которых молекулярно-фармакологические свойства известны. Хемоинформационный анализ позволяет выявить молекулы, схожие с исследуемыми (рис. 1) и, соответственно, предположить физиологические, фармакологические и другие свойства исследуемых молекул с использованием алгоритмов т. н. машинного обучения.

Для проведения хемоинформационного анализа ранее был разработан новый математический метод, основанный на комбинаторной теории разрешимости [3–7] в применении к хемографам (χ-графам) – математическим объектам, представляющим собой совокупности множества вершин и множества рёбер и используемым для описания структур молекул. С использованием множества χ (множество элементарных χ-инвариантов, т. е. фрагментов химической структуры), и *метрики Хэмминга*, функция расстояния между хемографами d_χ определяется как:

$$d_\chi(X_1, X_2) = \frac{1}{|\chi|}\sum_{i=1}^{|\chi|} \hat{\imath}[i]\hat{\beta}[X_1]\chi \oplus \hat{\imath}[i]\hat{\beta}[X_2]\chi,$$

где $\hat{\imath}_\chi$ – кортеж-инвариант (список фрагментов структур, применимый к структуре любой молекулы. Данное выражение, отражающее «химическое расстояние» между двумя произвольными молекулами, и было использовано для решения задачи прогнозирования свойств молекул. На первом этапе хемоинформационного анализа с использованием расстояния d_χ устанавливается список наиболее близких химических структур. На втором этапе — для каждой молекулы из баз данных извлекаются все имеющиеся данные

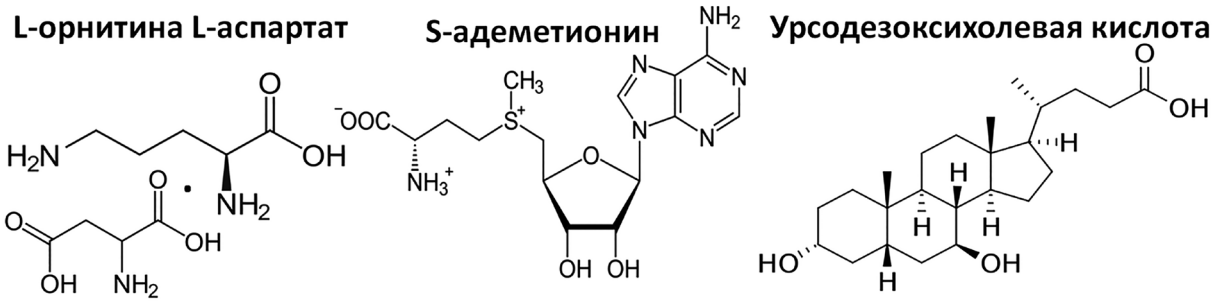


Рис. 1. Химические формулы исследованных молекул
Figure 1. Chemical formulas of the studied molecules

экспериментального измерения различных биологических свойств этой молекулы и проводятся оценки соответствующих констант связывания, констант ингибирования и др.

Результаты / Results

Полученные результаты хемореактомного анализа позволили оценить дополнительные механизмы воздействия исследованных веществ на обмен уратов (табл. 1), на вазоактивность (табл. 2), на структуру и функцию сосудов (табл. 3) и на цитопротекторную (прежде всего, нейропротекторную) активность исследованных веществ (табл. 4). В таблице 1 представлены результаты хемореактомного анализа воздействия исследованных веществ на обмен уратов.

Хемореактомный анализ показал, что орнитин способствует снижению уровней мочевой кислоты в сыворотке крови крыс через 6 ч после приёма *per os* (на –16 %, другие молекулы: –4,6...–11 %, табл. 1). Этот результат подтверждается результатами оценки урикозурической активности на модели гиперурикемии, индуцированной оксонатом калия у мышей (снижение на 25–32 %).

Снижение уровней уратов в крови может быть связано с *ингибированием орнитином уратного транспортёра URAT1* (орнитин – IC_{50} = 65 нМ, S-АМ – 1060 нМ, УДХК – 94 нМ). Напомним, что более низкие значения константы IC_{50} соответствуют большему эффекту вещества (т. е. для ингибирования активности на 50 % требуется меньшая концентрация действующего вещества). Почти у 90 % пациентов с

Таблица 1

Воздействия исследованных веществ на обмен уратов

Table 1

Effects of the investigated substances on urate metabolism

Активность	Орг.	Ед.	Конст.	Орнит.	S-АМ	УДХК
Ингибирование уратного транспортёра URAT1	Чел.	нМ	IC_{50}	64,83	1 060	94,2
Ингибирование образования ксантиноксидазой мочевой кислоты (50 мкг/мл в-ва, 5 минут)	Чел.	%	Инг.	32,45	4,633	26,35
Ингибирование ксантиноксидазы как снижение образования мочевой кислоты	Чел.	нМ	IC_{50}	909,9	11 040	9 655
Снижение уровня мочевой кислоты в сыворотке крови крыс через 6 ч после перорального приёма	Крысы	%	Акт.	–16	–4,6	–11
Ингибирование гемоксидазы-1 крыс	Крысы	нМ	IC_{50}	3 815	33 411	40 132

Примечания: Орг. – организм; Чел – человек; Ед. – единицы измерения; Конст. – константа; Орнит. – орнитина аспартат; S-АМ – S-адеметионин; УДХК – урсодезоксихолевая кислота.
Notes: Орг. (Org.) – organism; Чел (Man) – man; Ед. (Unit) – units of measurement; Конст. (Const.) – constant; Орнит. (Ornith.) – ornithine aspartate; S-AM – S-ademetionine; УДХК (UDCA) – ursodeoxycholic acid.

Таблица 2

Воздействие на вазоактивность (по результатам хемореактомного анализа)

Table 2

Effects on vasoactivity (based on the results of chemoreactom analysis)

Активность	Орг.	Ед.	Конст.	Орнит.	S-АМ	УДХК
Ингибирование NOS нейронов человека (nNOS)	Чел.	нМ	IC_{50}	1 772	1 475	1 362
Ингибирование NOS эндотелия человека (eNOS) как снижение продукции оксида азота	Чел.	нМ	Ki	4 461	2 950	2 530
Ингибирование NOS нейронов крысы (nNOS)	Крысы	нМ	Ki	501,8	94,3	51,97
Отношение IC_{50} для вазодилататорной активности беномила (контроль) в грудной аорте крыс к IC_{50} для иссл. в-ва.	Крысы	у.е.	Акт.	5,006	4,367	3,54
Вазодилатация вызванного норадреналином сокращения грудной аорты крыс (20 мкМ)	Крысы	%	Акт.	14,95	15,91	8,548
Вазорелаксантная активность в грудном сегменте аорты крыс как ингибирование сокращений, вызванных фенилэфрином	Крысы	нМ	IC_{50}	1 918	3 085	2 414
Активность адренорецептора α1 как антагонизм по отношению к сокращению грудной аорты, вызванному норадреналином	Крысы	нМ	Kd	35,16	1 108	1 428

Примечания: Орг. – организм; Чел – человек; Ед. – единицы измерения; Конст. – константа; Орнит. – орнитина аспартат; S-АМ – S-адеметионин; УДХК – урсодезоксихолевая кислота.
Notes: Орг. (Org.) – organism; Чел (Man) – man; Ед. (Unit) – units of measurement; Конст. (Const.) – constant; Орнит. (Ornith.) – ornithine aspartate; S-AM – S-ademetionine; УДХК (UDCA) – ursodeoxycholic acid

Таблица 3

Другие воздействия исследованных веществ на структуру и функцию сосудов (по результатам хемореактомного анализа)

Table 3

Other effects of the investigated substances on the structure and function of blood vessels (according to the results of chemoreactomic analysis)

Активность	Орг.	Ед.	Конст.	Орнит.	S-AM	УДХК
Ингибирование ангиогенеза в эндотелиоцитах (микроскопия)	Чел.	нМ	IC_{50}	619,9	768,8	66,25
Ингибирование адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов, предварительная инкубация	Чел.	Мкг/ мл	IC_{50}	12,37	12,74	16,36
Ингибирование эндотелиальной липазы	Чел.	нМ	IC_{50}	258,2	332,9	3536
Антидислипидемическая активность на модели гиперлипидемии крыс как образование свободной жирной кислоты на 1 мл плазмы (100 мг/кг *per os*)	Крысы	%	Акт.	9,348	10,24	4,553
Ингибирование MMP13 через 4 часа (флуориметрия)	Чел.	нМ	IC_{50}	670,5	1 545	1 399
Ингибирование MMP2 через 4 часа (флуориметрия)	Чел.	нМ	IC_{50}	568	621,3	13 700
Примечания: Орнит. – орнитина аспартат; S-AM – S-адеметионин; УДХК –урсодезоксихолевая кислота. *Notes*: Орнит. (Ornith.) – ornithine aspartate; S-AM – S-ademetionine; УДХК (UDCA) – ursodeoxycholic acid.						

Таблица 4

Цитопротекторная активность исследованных веществ

Table 4

Cytoprotective activity of the investigated substances

Активность	Орг.	Ед.	Конст.	Орнит.	S-AM	УДХК
Антиоксидантная активность в клетках линии DLD1 человека как уровень глутатиона на мг белка	Чел.	нМ/мг	Акт.	3,88	3,704	2,88
Нейропротекторная активность в нейронах SH-SY5Y как повышение уровня глутатиона	Чел.	нМ/мг	Акт.	24,45	20,51	18,4
Ингибирование метаботропного рецептора глутамата mGluR5 как снижение высвобождения кальция (10 мкМ).	Чел.	%	Инг.	30,32	16,37	21,16
Противоаллергическая активность как ингибирование реакции пассивной кожной анафилаксии, вызванной яичным альбумином (10 мг/кг, в/в)	Крысы	%	Инг.	83,03	34,08	46,09
Ингибирование простагландин D-синтазы гемопоэза (HPGDS)	Чел.	нМ	IC_{50}	54,27	92,82	64,5
Ингибирование индуцированного CCL3 хемотаксиса Т-лимфоцитов человека (острое воспаление)	Чел.	нМ	IC_{50}	38,2	35,6	6 272
Ингибирование активации Т-лимфоцитов периферической крови	Чел.	нМ	IC_{50}	928	833,8	317,9
Иммуносупрессивная активность, оцененная как ингибирование реакции аллогенных лимфоцитов	Чел.	нМ	IC_{50}	5 038	746,5	3 540
Примечания: Орнит. – орнитина аспартат; S-AM, S-адеметионин; УДХК – урсодезоксихолевая кислота. *Notes*: Орнит. (Ornith.) – ornithine aspartate; S-AM – S-ademetionine; УДХК (UDCA) – ursodeoxycholic acid.						

гиперурикемией это состояние формируется вследствие недостаточного выведения уратов. Ингибиторы белков-транспортёров уратов усиливают выведение уратов за счёт ингибирования канальцевой реабсорбции и применяются для лечения подагры [9]. URAT1 — белок-траспортёр, осуществляющий реабсорбцию уратов из крови. Таким образом, ингибирование URAT1 будет усиливать выведение уратов почками посредством блокады реабсорбции урат-аниона [10].

Кроме того, орнитин может способствовать снижению избыточного образования уратов посредством ингибирования ксантиноксидазы, что приводит к снижению биосинтеза мочевой кислоты. Константа ингибирования ксантиноксидазы для орнитина со-

ставила IC_{50} = 910 нМ и была на порядок выше для остальных молекул (IC_{50} = 9655–11040 нМ). При фиксированной концентрации веществ (50 мкг/мл) наибольшая степень ингибирования была показана также для орнитина (32,5 %, другие молекулы — 4,6–26 %).

Метаболизм уратов взаимосвязан с метаболизмом билирубина и липидов [11]. Хемореактомный анализ показал, что орнитин, в отличие от других исследованных молекул, может ингибировать гемоксидазу-1 (ГО-1) крыс и снижать образование билирубина. Константа ингибирования фермента ГО-1 составила IC_{50} = 3815 нМ и была на порядок выше для двух других молекул (33411–40132 нМ). ГО-1 поддерживает катаболизм гема, приводя к образованию биливердина и монооксиси углерода (CO). Ингибиторы гемоксидаз изучаются как средства для лечения гипербилирубинемии.

Ещё одним интересным результатом хемореактомного анализа является воздействие орнитина на вазоактивность и также на структуру и функцию сосудов. В табл. 2 суммированы результаты хемореактомного анализа вазоактивных свойств исследованных веществ, включая активность адренорецепторов, синтаз оксида азота (NOS) и оценки вазорелаксантного действия веществ на аорту крыс.

Среди исследованных молекул орнитин отличался наиболее выраженными вазодилаторными свойствами. Например, отношение EC_{50} для вазодилататорной активности контроля (беномил) в грудной аорте крыс к EC_{50} для веществ было наибольшим именно для орнитина (5,0, другие молекулы – 3,5–4,3). Наиболее вероятным механизмом вазодилаторного действия орнитина является *антиадренергический*: константа ингибирования адренорецептора α1 у крыс, оцененная как антагонизм по отношению к сокращению грудной аорты, вызванному норадреналином, составила Kd = 35 нМ для орнитина и была в 30–40 раз выше для остальных веществ (1108 и 1428 нМ). При фиксированной концентрации веществ (20 мкМ) ингибирование вызванного норадреналином сокращения грудной аорты составило 15 % для орнитина и S-AM, будучи несколько ниже для УДХК (8,5 %). Оценка вазорелаксантной активности в грудном сегменте аорты крыс как ингибирование сокращений, вызванных фенилэфрином, также была наилучшей для орнитина (IC_{50} = 1918 нМ), чем для двух других молекул (2414–3085 нМ).

При рассмотрении хемореактомных оценок вазодилаторных свойств исследованных молекул следует отметить, что орнитин в наименьшей степени влиял на активность ферментов NO-синтетаз, осуществляющих биосинтез оксида азота (NO) – важной вазодилаторной молекулы. В частности, константа ингибирования NOS эндотелия человека (eNOS) как снижение продукции NO с использованием L-аргинина в качестве субстрата составила Ki = 4461 нМ и была ниже для S-AM (2950 нМ) и для УДХК (2530 нМ). В случае нейрональной NOS крыс (nNOS) ингибирование nNOS было минимальным для орнитина (Ki = 502 нМ, другие молекулы – 52–94 нМ).

В табл. 3 суммированы хемореактомные оценки других воздействий исследованных веществ на структуру и функцию сосудов: ангиогенез, агрегацию тромбоцитов, показатели липидного профиля и ремоделирование стенок сосудов (матриксные металлопротеиназы).

В соответствии с хемореактомными оценками результатов микроскопических исследований *ингибирования ангиогенеза* в культуре эндотелиоцитов орнитин (IC_{50} = 620 нМ) и S-AM (IC_{50} = 769 нМ) в наименьшей степени могут влиять на ангиогенез, тогда как УДХК может более выражено ингибировать ангиогенез (IC_{50} = 66 нМ). Орнитин (IC_{50} = 12,4 мкг/мл) и S-AM (IC_{50} = 12,7 мкг/мл) в большей степени способствовали *ингибированию адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов*, чем УДХК (IC_{50} = 16,4 мкг/мл).

Антидислипидемическая активность исследованных веществ на модели гиперлипидемии у крыс оценивалась в ходе хемореактомного анализа как образование свободной жирной кислоты на 1 мл плазмы крови при приёме 100 мг/кг вещества *per os*. Наибольшая активность установлена для орнитина (9,4 %) и S-AM (10,2 %), наименьшая – для УДХК (4,6 %). Антидислипидемическое действие орнитина связано, вероятно, с *ингибированием эндотелиальной липазы* (IC_{50} = 258 нМ, S-AM: IC_{50} = 333 нМ), которая в гораздо меньшей степени может ингибироваться УДХК (IC_{50} = 3536 нМ). Ингибирование эндотелиальной липазы повышает уровень липопротеина высокой плотности (ЛПВП) в плазме крови, что соответствует снижению риска атеросклероза.

Орнитин в большей степени способствует ингибированию матриксных металлопротеиназ, способствующих нежелательному ремоделированию стенок сосудов при воспалении и атеросклерозе. В частности, хемореактомные оценки результатов флуориметрии показали более выраженное ингибирование орнитином металлопротеиназ человека MMP13 (IC_{50} = 670 нМ, другие молекулы: 1399–1545 нМ) и MMP2 (IC_{50} = 568 нМ, S-AM: 621 нМ, УДХК: 13700 нМ). Снижение активности матриксных металлопротеиназ соответствует замедлению атеросклеротических изменений в стенках сосудов.

В табл. 4 суммированы хемореактомные оценки цитопротекторной активности исследованных веществ, включая антиоксидантные свойства, нейропротекторную активность и противовоспалительные эффекты.

Цитопротекторные эффекты орнитина ассоциированы с *усилением синтеза глутатиона*, а в нейронах — также и со снижением глутаматергической эксайтотоксичности. Так, хемореактомная оценка антиоксидантной активности как уровня глутатиона

на 1 мг белка в клетках линии DLD1 была наибольшей для орнитина (3,9 нМ/мг) и S-AM (3,7 нМ/мг) и наименьшей для УДХК (2,88 нМ/мг). Нейропротекторная активность в нейронах SH-SY5Y, оцененная как повышение уровней глутатиона, также была наибольшей для орнитина (24,5 нМ/мг, другие молекулы: 18,4–20,5 нМ/мг).

Нейропротекторная активность орнитина связана с ингибированием метаботропного рецептора глутамата mGluR5, оцененной как снижение высвобождения кальция, индуцированного L-глутаматом при фиксированной концентрации исследованных веществ (10 мкМ). Ингибирование глутаматергического высвобождения кальция (которое способствует усилению апоптоза нейронов) было наибольшим для орнитина (30,3 %, другие молекулы: 16,3–21,1 %).

Важный вклад в цитопротекторное действие орнитина может вносить *противовоспалительное действие*. Например, для орнитина была показана наибольшая противоаллергическая активность, оцененная как ингибирование реакции пассивной кожной анафилаксии, вызванной яичным альбумином у крыс. При введении веществ в фиксированной концентрации (10 мг/кг, в/в) противоаллергическая активность составила 83 % для орнитина и только 34–46 % для двух других молекул.

Противовоспалительные/противоаллергические эффекты орнитина, вероятно, связаны с ингибированием простагландин D-синтазы гемопоэза HPGDS. Константа ингибирования была наименьшей для орнитина (IC_{50} = 54 нМ, другие молекулы: 64,5–92,8 нМ). Блокада биосинтеза простагландина PGD2 способствует отсрочке начала приступа аллергической астмы, уменьшению эозинофильного воспаления, облегчения симптомов аллергического ринита и кашля и, также, уменьшает нежелательное ремоделирование соединительно-тканной основы дыхательных путей.

В систематическом анализе фармакологии орнитина было показано, что орнитин влияет на активацию Т-лимфоцитов [1]. Результаты настоящего хемореактомного анализа показали, что орнитин и S-AM могут ингибировать хемотаксис Т-лимфоцитов человека, индуцируемый белком острой фазы воспаления CCL3 (табл. 4, IC_{50} = 35..38 нМ, УДХК – 6272 нМ). В то же время, орнитин в наименьшей степени участвует в ингибировании активации Т-лимфоцитов периферической крови (IC_{50} = 928 нМ) и проявляет наименьшие иммуносупрессивные эффекты (IC_{50} = = 5038 нМ). Иными словами, орнитин характеризуется мягким иммуномодулирующим действием на Т-лимфоциты, включающим снижение интенсивности острого воспаления без иммуносупрессии.

Заключение / Conclusion

Орнитин (в форме орнитина аспартата) традиционно используется в качестве гепатопротектора. Гепатопротекторное действие орнитина связано с его участием в орнитиновом цикле (восстанавливает активность ферментов клеток печени – орнитин-карбамоилтрансферазы и карбамоил-фосфатсинтетазы). В результате проведения хемореактомного анализа орнитина аспартата показано несколько направлений исследований, перспективных для оценки терапевтического потенциала орнитина аспартата в кардиологии и нефрологии.

Потенциальное кардиопротекторное действие орнитина реализуется через вазодилатацию, антидислипидемическую активность и цитопротекцию. В соответствии с хемореактомными оценками, вазодилаторные эффекты орнитина связаны с ингибированием адренорецепторов (Kd = 35 нМ) и минимальным вмешательством в метаболизм оксида азота (NO). Антидислипидемическая активность орнитина опосредована, вероятно, ингибированием эндотелиальной липазы (IC_{50} = 258 нМ). Цитопротекторные эффекты орнитина связаны, в частности, с антиоксидантным эффектом вследствие повышения синтеза глутатиона.

Потенциальное нефропротекторное действие орнитина аспартата заключается, прежде всего, в нормализации обмена уратов в связи с ингибированием уратного транспортёра URAT1 (IC_{50} = 65 нМ) и ксантиноксидазы (IC_{50} = 910 нМ). Благоприятное воздействие на воспаление (ингибирование простагландин D-синтазы, ингибирование хемотаксиса Т-лимфоцитов в острой фазе воспаления) важно и для кардио-, и для нефропротекции. Таким образом, хемореактомный анализ указал на широкий спектр биологического действия орнитина аспартата, включающий гепатопроекцию, кардиопротекцию и нефропротекцию. В России представлен комплекс Гепа-Мерц (гранулы д/приготовления р-ра д/приёма внутрь), который содержит 3 г аспартата орнитина. L-орнитин-L-аспартат быстро диссоциирует на орнитин и аспартат и начинает действовать в течение 15–25 мин, имея короткий период полувыведения ($T_{1/2}$).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Благодарность. «Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-12-00175)»

Acknowledgement. This work was financially supported by the grant of the Russian Science Foundation (N20-12-00175).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Торшин Иван Юрьевич
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2659-7998
SPIN-код: 1375-1114
к. х. н., с. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва, Россия

Torshin Ivan Yu.
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2659-7998
SPIN code: 1375-1114
Candidate of Chemical Sciences, Senior researcher FRC CSC RAS, Moscow, Russia

Громова Ольга Алексеевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: unesco.gromova@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7663-710X
SPIN-код: 6317-9833
д. м. н, профессор, в. н. с., научный руководитель ФИЦ ИУ РАН, Москва, Россия

Gromova Olga A.
Corresponding author
e-mail: unesco.gromova@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-7663-710X
SPIN code: 6317-9833
Dr. Sci. (Med.), Professor FRC CSC RAS, Moscow, Russia

Литература / References

1. Громова О.А., Торшин И.Ю., Лазебник Л.Б., Максимов В.А. Систематический компьютерный анализ исследований орнитина для выявления наиболее перспективных трендов терапевтического использования — акцент на функцию печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;(7):30–36. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-191-7-30-36/ [Gromova OA, Torshin IYu, Lazebnik LB, Maksimov VA. Systematic computer analysis of ornithine research to identify the most promising trends in therapeutic use — focus on liver function. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021; (7): 30–36. (In Russ).].

2. Торшин И.Ю., Громова О.А., Максимов В.А. Хемомикробиомный анализ молекулы орнитина. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021; 6. [Torshin IYu, Gromova OA, Maksimov VA. Chemomicrobiome analysis of ornithine. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;(7):78–82. (In Russ).]

3. Torshin IYu, Rudakov KV. On the Application of the Combinatorial Theory of Solvability to the Analysis of Chemographs: Part 2. Local Completeness of Invariants of Chemographs in View of the Combinatorial Theory of Solvability. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2014;24(2):196–208. DOI: 10.1134/S1054661814020151.

4. Torshin IYu, Rudakov KV. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. Part 2: metric approach within the framework of the theory of classification of feature values. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2017;27(2):184–199. DOI: 10.1134/S1054661817020110.

5. Torshin IYu. The study of the solvability of the genome annotation problem on sets of elementary motifs. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2011;21(4):652–662. DOI: 10.1134/S1054661811040171.

6. Torshin IY. Optimal dictionaries of the final information on the basis of the solvability criterion and their applications in bioinformatics. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2013;23(2):319–327. DOI: 10.1134/S1054661813020156.

7. Torshin IYu, Rudakov KV. On the theoretical basis of metric analysis of poorly formalized problems of recognition and classification. Pattern *Recognition and Image Analysis*. 2015;25(4):577–587. DOI: 10.1134/S1054661815040252.

8. Torshin IYu, Rudakov KV. On the procedures of generation of numerical features over the splits of a set of objects and the problem of prediction of numeric target variables. *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2019, Vol. 29, No. 4, pp. 654–667. ISSN 1054-6618 DOI: 10.1134/S1054661819040175

9. Silverman W, Locovei S, Dahl G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Sep;295(3):C. 761–767. DOI: 10.1152/ajpcell.00227.2008.

10. Dong Y, Zhao T, Ai W, Zalloum WA, Kang D, Wu T, Liu X, Zhan P. Novel urate transporter 1 (URAT1) inhibitors: a review of recent patent literature (2016-2019). *Expert Opin Ther Pat*. 2019 Nov;29(11):871–879. DOI: 10.1080/13543776.2019.1676727.

11. Hullin DA, McGrane MT. Effect of bilirubin on uricase-peroxidase coupled reactions. Implications for urate measurement in clinical samples and external quality assessment schemes. *Ann Clin Biochem*. 1991 Jan;28 (Pt 1):98–100. DOI: 10.1177/000456329102800117.

Издательство
ОКИ

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

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

Сайт журнала: www.clinvest.ru

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

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

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru

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

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

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

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