DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-7-32-35

КИНЕТИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ НОВОГО НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО СРЕДСТВА ГЗК-111 И ЕГО АКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА ЦИКЛО-L-ПРОЛИЛГЛИЦИНА В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ КРЫС

А. Л. Подолько[1], П. О. Бочков[1], А. А. Литвин[1], Г. Б. Колыванов[1], О. Ю. Кравцова[1,*], С. С. Бойко[1], Е. А. Кузнецова[1], В. П. Жердев[1]

Изучена кинетика распределения соединения, обладающего нейропротекторной активностью, этилового эфира *N*-фенилацетилглицил-L-пролина (ГЗК-111) и его метаболита — цикло-L-пролилглицина (ЦПГ) в тканях и органах крыс после однократного внутрижелудочного введения в дозе 20 мг/кг. Определены величины тканевой доступности ГЗК-111 и ЦПГ. Тканевая доступность ГЗК-111 в системе "печень — плазма крови" составила 8,6, "почки — плазма крови" — 0,7, "селезёнка — плазма крови" — 2,7. В мышцах и в головном мозге (органе-мишени) исследуемое вещество не обнаружено. Тканевая доступность ЦПГ в системе "печень — плазма крови" составила 1,4, "почки — плазма крови" — 1,4, "селезёнка — плазма крови" — 1,15. Для головного мозга этот параметр ЦПГ равнялся 0,003. Установлено, что ЦПГ в 1,3 – 4,7 раза дольше выводится из организма животных в сравнении с ГЗК-111 — так, период полувыведения ЦПГ составил 0,7 ч для головного мозга, 0,9 ч для почек и селезёнки, 1,4 ч для печени.

Ключевые слова: нейропротектор; ГЗК-111; цикло-L-пролилглицин; фармакокинетика; ВЭЖХ-масс-спектрометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Важным и обязательным этапом при проведении фармакокинетических исследований является изучение тканевой доступности ($f_т$) новых оригинальных лекарственных средств (ЛС). Основным результатом процессов распределения является транспорт ЛС в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими эффект ЛС. На основании определения величины $f_т$ возможна количественная оценка интенсивности проникновения действующего вещества в периферические ткани [4].

В ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова" синтезирован линейный замещённый дипептид, этиловый эфир *N*-фенилацетилглицил-L-пролина (ГЗК-111), строение которого предполагает возможность его превращения в биологических средах в цикло-L-пролилглицин (ЦПГ) [5]. Спектр нейропсихотропной активности ГЗК-111 (0,1 – 10 мг/кг, внутрибрюшинно) совпадает с таковым для ЦПГ (0,05 – 5 мг/кг, внутрибрюшинно) и включает нейропротекторную, антиамнестическую, анксиолитическую, антигипоксическую, антидепрессивную и анальгетическую активность [6]. Фармакологические эффекты замещенного дипептида ГЗК-111 сохраняются и при введении через рот в дозах 10, 30 и 40 мг/кг [3].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении кинетики распределения нового нейропротектора ГЗК-111 и его активного метаболита — ЦПГ в органах и тканях крыс после однократного внутрижелудочного (в/ж) введения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали субстанции, синтезированные в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ "НИИ фармакологии им. В. В. Закусова": этиловый эфир *N*-фенилацетилглицил-L-пролина (серия 435; рис. 1, *а*) и цикло-L-пролилглицин (серия КЗ-36; рис. 1, *б*) [1].

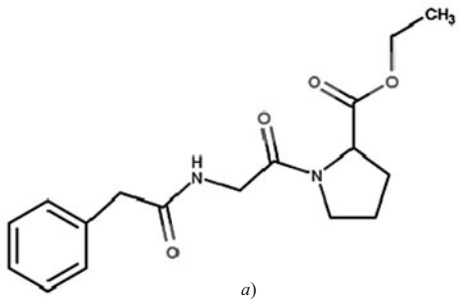
Исследование проведено на половозрелых беспородных крысах-самцах с массой тела 180 – 220 г. Животные содержались в лабораторном виварии при 20 – 22 °С, относительной влажности воздуха 45 – 65 %, имели постоянный доступ к корму и воде. Эксперименты проводили в соответствии с решением Совета Евразийской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

Изучение кинетики распределения ГЗК-111 и ЦПГ в органах и тканях крыс проводили после однократного в/ж введения фармацевтической субстанции в дозе 20 мг/кг. Исследуемое вещество вводили в виде суспензии в 1 % крахмальном клейстере.

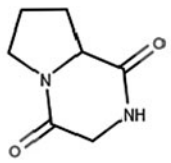
Содержание ГЗК-111 и ЦПГ определяли в плазме крови и гомогенатах органов до введения исследуемого вещества (контроль) и через 0,08, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 и 4,0 ч после введения. Образцы крови крыс получали после декапитации животных. Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены в соответствии с нормативной документацией (ГОСТ

[1] ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова", Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
* e-mail: mojaevdim@mail.ru

© 2022 Коллектив авторов



а)



б)

Рис. 1. Структурные формулы *N*-фенилацетилглицил-L-пролина (ГЗК-111) (*а*) и цикло-L-пролилглицина (ЦПГ) (*б*).

33215-2014, ГОСТ 33216-2014), касающейся гуманного обращения с животными, и стандартными операционными процедурами лаборатории фармакокинетики ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова". Проведение экспериментов с животными одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова".

Для количественного определения ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови и гомогенатах органов/тканей животных использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием. Нижний предел количественного определения составил 1 нг/мл (г) для ГЗК-111 и ЦПГ соответственно [2].

Расчёт фармакокинетических (ФК) параметров ГЗК-111 и ЦПГ проводили немодельным методом. ФК-кривые ("концентрация лекарственного вещества/метаболита — время") были построены по усреднённым значениям концентраций ГЗК-111 и его метаболита в органах и тканях в дискретные интервалы времени, полученным у 5 животных в каждый временной интервал.

Основные расчётные ФК-параметры: $AUC_{0\text{-}t}$, $AUC_{0\text{-}\infty}$ — площадь под ФК кривой (площадь под кривой концентрация соединения — время); T_{max} — время достижения максимальной концентрации исследуемого соединения в плазме крови; C_{max} — максимальная концентрация; MRT — среднее время удерживания исследуемого соединения в организме; k_{el} — константа скорости элиминации; $t_{1/2el}$ — период полувыведения исследуемого соединения; $f_т$ — тканевая доступность — величина, характеризующая интенсивность распределения вещества в органах и тканях, рассчитывается по формуле:

$$f_т = \frac{AUCт_{0–t\ last}}{AUCр_{0–t\ last}},$$

где $AUCт_{0\text{-}t\ last}$ — AUC в ткани/органе и $AUCр_{0\text{-}t\ last}$ — AUC в плазме крови, рассчитанные для одного и того же t_{last} [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение соединения ГЗК-111 изучали в органах и тканях, отличающихся друг от друга степенью кровоснабжения (селезёнка, скелетные мышцы), органах, обеспечивающих элиминацию (печень, почки), органе-мишени (головной мозг).

В распределении нейропротектора по органам прослеживается значительная гетерогенность. Установлено, что ГЗК-111 регистрируется не во всех исследуемых органах и тканях (не обнаружен в мышцах и головном мозге).

Усреднённые ФК-профили ГЗК-111 в органах и тканях крыс после однократного в/ж введения представлены на рис. 2.

Поскольку ФК-кривые построены по средним значениям, при расчётах фармакокинетических парамет-

Таблица 1. **Фармакокинетические параметры ГЗК-111 в органах и тканях крыс после однократного внутрижелудочного введения фармацевтической субстанции ГЗК-111 в дозе 20 мг/кг**

Параметры	Единицы измерения	Органы и ткани			
		Печень	Почки	Селезёнка	Плазма крови
C_{max}	нг/мл	1,20	0,12	0,43	0,18
T_{max}	ч	0,5	0,08	0,25	0,25
$AUC_{0\to t\ last}$ (t_{last})	нг/мл(г) · ч (ч)	0,39 (2,0)	0,04 (1,5)	0,15 (1,5)	0,10 (1,0)
k_{el}	$ч^{-1}$	2,3065	0,9841	2,3659	1,5982
$t_{1/2el}$	ч	0,30	0,70	0,29	0,43
MRT	ч	0,40	1,41	0,32	0,69
$AUC_{0\to\infty}$	нг/мл (г) · ч	3,34	0,12	1,00	0,30
$AUC_{0\to1}$	нг/мл(г) · ч	0,86	0,07	0,27	0,10
$f_т$		8,6	0,7	2,7	–

Примечание: величину $f_т$ рассчитывали исходя из значения $AUC_{0\to1}$, поскольку последнюю значимую концентрацию ГЗК-111 в плазме крови удалось зарегистрировать через 1,0 ч после введения.

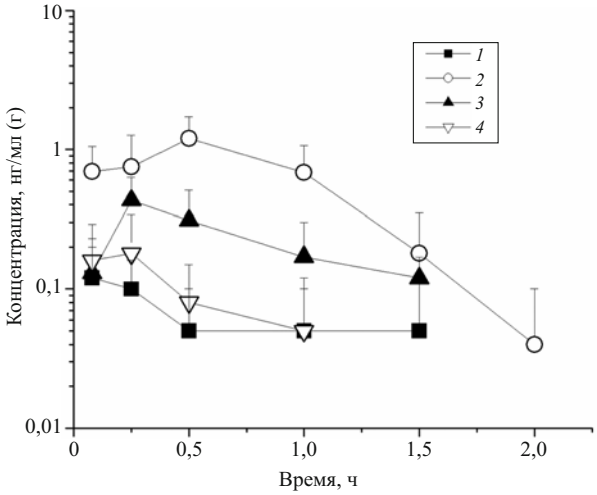


Рис. 2. Фармакокинетические профили ГЗК-111 в органах и тканях крыс после однократного внутрижелудочного введения ГЗК-111 в дозе 20 мг/кг (n = 5; среднее ± стандартное отклонение): *1* – почки; *2* — печень; *3* – селезёнка; *4* – плазма крови.

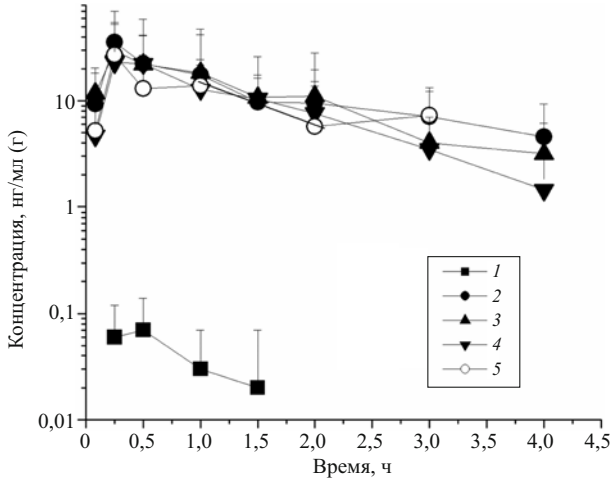


Рис. 3. Фармакокинетические профили ЦПГ в органах и тканях крыс после однократного внутрижелудочного введения ГЗК-111 в дозе 20 мг/кг (n = 5; среднее ± стандартное отклонение): *1* – мозг; *2* – печень; *3* – почки; *4* – селезёнка; *5* – плазма крови.

ров отсутствует статистическая обработка результатов. Фармакокинетические характеристики исследуемого соединения в плазме крови животных представлены в табл. 1. Изучаемое соединение определялось в органах в течение 1,5 – 2,0 ч. T_{max} ГЗК-111 в исследуемых органах составило 0,08 – 0,5 ч (табл. 1). Значения C_{max} нейропротектора возрастали в ряду: почки — плазма крови — селезёнка — печень (0,12; 0,18; 0,43; 1,20 нг/мл(г), соответственно). Анализ величин $f_т$ ГЗК-111 показал, что исследуемое соединение распределяется в хорошо васкуляризированные органы (печень, селезёнка, почки).

Вообще $f_т$ — величина относительная, её значение не зависит от способа введения исследуемого вещества и обусловливается исключительно его физико-химическими свойствами [3] (табл. 1).

Тканевая доступность ГЗК-111 в системе “печень — плазма крови” составила 8,6; “почки — плазма крови” — 0,7; “селезёнка — плазма крови” — 2,7. Следует отметить, что $f_т$ ГЗК-111 в таких органах, как селезёнка, была в 2,6 раза ниже по сравнению с печенью — органом, обеспечивающим элиминацию. Анализ фармакокинетических параметров, характеризующих элиминацию изучаемого соединения, позволяет заключить, что ГЗК-111 быстро выводится из организма животных: $t_{1/2el}$ составил не более 0,7 ч, *MRT* не более 1,41 ч.

Усреднённые ФК-профили ЦПГ в плазме крови, органах и тканях крыс после однократного в/ж введения представлены на рис. 3.

ФК-параметры исследуемого соединения в плазме крови животных представлены в табл. 2. Изучаемое соединение определяется в органах в течение 1,5 – 4,0 ч. Кинетика активного метаболита ГЗК-111 в гомогенатах органов характеризуется большой вариабельностью. В контрольных образцах плазмы крови и

Таблица 2. **Фармакокинетические параметры ЦПГ в плазме крови и различных тканях крыс после однократного внутрижелудочного введения фармацевтической субстанции ГЗК-111 в дозе 20 мг/кг**

Параметры	Органы и ткани				
	Печень	Почки	Селезёнка	Головной мозг	Плазма крови
C_{max}, нг/мл	35,76	29,43	22,98	0,07	27,13
T_{max}, ч	0,25	0,25	0,25	0,50	0,25
$AUC_{0\to t}$, нг/мл(г) · ч (t_{last}, ч)	47,14 (4,0)	44,42 (4,0)	35,36 (4,0)	0,06 (1,5)	36,42 (3,0)
k_{el}, $ч^{-1}$	0,4961	0,7498	0,7360	1,0125	0,5014
$t_{1/2el}$, ч	1,40	0,92	0,94	0,68	1,38
MRT, ч	1,85	1,66	1,47	1,38	2,43
$AUC_{0\to\infty}$, нг/мл(г) · ч	38,35	42,57	42,85	0,08	26,64
$AUC_{0\to1,5}$	28,22	27,82	22,80	0,06	19,82
$f_т$	1,40	1,40	1,15	0,003	–

Примечание: величину $f_т$ рассчитывали исходя из значения $AUC_{0\to1,5}$, поскольку последнюю значимую концентрацию ЦПГ в мозге удалось зарегистрировать через 1,5 ч после введения ГЗК-111.

гомогенатов органов и тканей крыс также обнаружено вещество с молекулярным ионом, соответствующим предполагаемому метаболиту ГЗК-111 — ЦПГ [2]. Оценку уровней экзогенного ЦПГ проводили после вычитания его эндогенного уровня, полученного после усреднения концентраций в 5 контрольных образцах: плазмы крови (41,14 нг/мл), гомогенатов головного мозга (0,92 нг/г), печени (36,82 нг/г), почек (15,18 нг/г), селезёнки (21,32 нг/г). В мышцах ЦПГ не обнаружен.

Фармакокинетика ЦПГ существенно отличалась от кинетики исходного соединения, прежде всего, высокими концентрациями, и как следствие, значениями площадей под ФК-кривыми (табл. 1, 2). T_{max} ЦПГ в исследуемых органах составило 0,25 – 0,5 ч (табл. 2). C_{max} ЦПГ в органах и тканях возрастала в ряду: головной мозг — селезёнка — плазма крови — почки — печень (0,07; 22,98; 27,13; 29,43; 35,76 нг/мл (г), соответственно). Установлено, что ЦПГ в 1,3 – 4,7 раза дольше выводится из организма животных в сравнении с ГЗК-111, на что указывают величины *MRT* и $t_{1/2el}$ (0,7 ч — для головного мозга, 0,9 ч — для почек и селезёнки, и 1,4 ч — для плазмы крови и печени) (табл. 1, 2).

ЦПГ распределяется в организме крыс сходным с ГЗК-111 образом — так, величины $f_т$ демонстрируют, что исследуемое соединение преимущественно проникает в хорошо васкуляризированные органы (табл. 2). $f_т$ в системе “печень —- плазма крови” и “почки — плазма крови” составила 1,4, “селезёнка — плазма крови” — 1,15, а для “головной мозг — плазма крови” всего 0,003.

Учитывая, что ГЗК-111 не обнаружен в головном мозге животных, можно предположить, что исследуемое вещество либо полностью разрушается эстеразами плазмы крови и ферментами печени до метаболитов, либо ГЭБ препятствует его проникновению в орган-мишень. При этом образующийся ЦПГ у здоровых животных проникает в головной мозг в количествах, ненамного превышающих эндогенный уровень. Возможно, в условиях патологии проницаемость ГЭБ для ЦПГ может изменяться.

ВЫВОДЫ

1. Соединение ГЗК-111 распределяется по органам и тканям неравномерно. Тканевая доступность ГЗК-111 в системе “печень — плазма крови” составила 8,6; “почки — плазма крови” — 0,7, “селезёнка — плазма крови” — 2,7. В скелетных мышцах и органе-мишени (головной мозг) исследуемое вещество не определялось.

2. Интенсивность проникновения метаболита ГЗК-111 — ЦПГ в органы и ткани снижается в ряду: печень — почки — селезёнка — головной мозг. ЦПГ в малых количествах проникает в орган-мишень — мозг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, К. Н. Колясникова, Е. А. Кузнецова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **50**(11), 3 – 8 (2016); doi: 10.30906 / 0023-1134-2016-50-11-3-8; *Pharm. Chem. J.*, **50**(11), 705 – 710 (2022).
2. Г. Б. Колыванов, П. О. Бочков, А. А. Литвин и др., *Бюл. экспер. биол. и мед.*, **172**(11), 618 – 621 (2021); doi:10.47056 / 0365-9615-2021-172-11-618-621.
3. К. Н. Колясникова, П. Ю. Поварнина, Е. А. Кузнецова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **55**(10), 10 – 13 (2021); doi: 10.30906 / 0023-1134-2021-55-10-10-13; *Pharm. Chem. J.*, 55(10), 1015-1018 (2022)..
4. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики новых лекарственных средств*, А. Н. Миронов (общ. ред.), часть 1, Гриф и Ко, Москва (2013).
5. С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, К. Н. Колясникова и др., Патент РФ 2646604, МПК C07K 5 / 00, A61K 38 / 05, A61P 25 / 00. Бюл. № 7 (2018).
6. K. N. Koliasnikova, P. Yu. Povarnina, A. V. Tallerova, et al., *Glyproline Pro-Ampakine with neuroprotective activity // Neuroprotection – New Approaches and Prospects*, *Matilde Otero-Losada*, *Francisco Capani and Santiago Perez Lloret*, Intech Open, DOI: 10.5772 / intechopen.91192. Available from: https: // www.intechopen.com / chapters / 71098

Поступила 07.03.22

DISTRIBUTION KINETICS OF NEW NEUROPROTECTOR COMPOUND GZK-111 AND ITS METABOLITE CYCLO-L-PROLYLGLYCINE IN RAT TISSUES AND ORGANS

A. L. Podol'ko[1], P. O. Bochkov[1], A. A. Litvin[1], G. B. Kolyvanov[1], O. Yu. Kravtsova[1,*], S. S. Boiko[1], E. A. Kuznetsova[1], and V. P. Zherdev[1]

[1] Research Zakusov Institute of Pharmacology, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia.

* e-mail: mojaevdim@mail.ru

The kinetics of distribution of *N*-phenylacetylglycyl-L-proline ethyl ether (compound GZK-111) possessing neuroprotective activity and its metabolite cyclo-L-prolylglycine (CPG) in rat tissues and organs have been studied after single intragastric administration at a dose of 20 mg/kg. The values of GZK-111 and CPG availability in tissues were determined. The tissue availability of GZK-111 was 8.6 in the liver–plasma system 0.7 in the kidney—plasma system, and 2.7 in the spleen—plasma system. The GZK-111 compound was not detected in the muscles and brain (the target organ). The tissue availability of CPG was 1.4 in the liver–blood plasma system, 1.4 in the kidney—plasma system, and 1.15 in the spleen—plasma system. As for the brain, this parameter of CPG was as small as 0.003. It was established that CPG is excreted from the body of animals 1.3– 4.7 times longer in comparison to GZK-111: the half-life of CPG was 0.7 h in the brain, 0.9 h in the kidneys and spleen, and 1.4 h in the liver.

Keywords: neuroprotector; GZK-111; cyclo-L-prolylglycine; pharmacokinetics; HPLC-mass spectrometry.