

ФАРМАКОКИНЕТИКА

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-8-21-25

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ *IN VITRO* И ФАРМАКОКИНЕТИКА ОСНОВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЭТИЛОВОГО ЭФИРА *N*-ФЕНИЛАЦЕТИЛГЛИЦИЛ-*L*-ПРОЛИНА (ГЗК-111) У КРЫС

О. Ю. Кравцова*, А. Л. Подолько, П. О. Бочков, А. А. Литвин,
Г. Б. Колыванов, С. С. Бойко, В. П. Жердев¹

Изучена метаболическая стабильность нового нейропротектора (этиловый эфир *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролина, ГЗК-111) в условиях инкубации с микросомальной фракцией печени мышей и определены фармакокинетические параметры основных метаболитов ГЗК-111 в плазме крови крыс после его однократного внутрижелудочного введения. В опытах *in vitro* обнаружены два продукта биотрансформации ГЗК-111 — *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролин (М-1) и *N*-фенилацетилглицин (М-2). В исследовании на крысах показано, что основные пути биотрансформации ГЗК-111 заключаются в образовании М-1 с последующей деградацией до М-2, а также циклического производного — циклопролилглицина (М-4). Степень превращения дипептида в метаболиты *in vivo* снижалась в ряду: М-1, М-2, М-4.

Ключевые слова: нейропротектор; ГЗК-111; *in vivo/in vitro* метаболизм; ВЭЖХ-масс-спектрометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Для определения основных путей биотрансформации фармакологических веществ (ФВ) в живых системах часто используют методы *in vitro*, в частности, метод инкубации исследуемого ФВ с микросомальной фракцией печени животных или человека [7]. В то же время одним из информативных фармакокинетических показателей, характеризующих биотрансформацию исходных соединений в метаболиты, является степень превращения ФВ в метаболит, рассчитываемая по отношению площади под фармакокинетической кривой метаболита к таковой неизмененного ФВ (AUC_M/AUC_P) [5].

В ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” создан и изучен этиловый эфир *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролина — дипептид с рабочим шифром ГЗК-111 [6]. Спектр нейропсихотропной активности данного ФВ после внутрибрюшинного введения (0,1 – 10 мг/кг) включает нейропротекторную, антиамнезическую, анксиолитическую, антигипоксическую, антидепрессивную и анальгетическую [8]. Фармакологические эффекты сохраняются и после внутрижелудочного введения в дозах 10, 30 и 40 мг/кг [3]. Ранее было показано, что ГЗК-111 в биологических средах превращается в цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ) [3], ко-

торый имеет такой же спектр нейропсихотропной активности, что и исходное соединение [4].

Цель настоящей работы — изучение *in vitro* метаболической стабильности соединения ГЗК-111 в условиях инкубации с микросомальной фракцией печени мышей, а также определение степени превращения ГЗК-111 в соответствующие метаболиты в живых системах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали субстанции, синтезированные в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”: этиловый эфир *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролина (ГЗК-111, серия 435) и цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ, серия КЗ-36 [2]), *N*-фенилацетилглицил-*L*-пролин (серия ЕК-450), *N*-фенилацетилглицин (серия ЕК-456). Фенилуксусная кислота (99%, Sigma-Aldrich, CAS номер 103-82-2, каталожный номер Р16621), пропранолола гидрохлорид (99 %, Sigma-Aldrich, CAS номер 318-98-9, каталожный номер Р0884).

Структурные формулы ГЗК-111 и его метаболитов представлены в табл. 1.

Для выяснения основных путей биотрансформации ГЗК-111 *in vitro* проводили исследования, заключающиеся в качественной оценке метаболической стабильности исследуемого ФВ после инкубации его с микросомальной фракцией печени мышей (GIBCO, Invitrogen, США) в течение 0, 15 и 30 мин при 37 °С. В инкубационной смеси финальная концентрация белка

¹ ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8.

* e-mail: mojaevdim@mail.ru

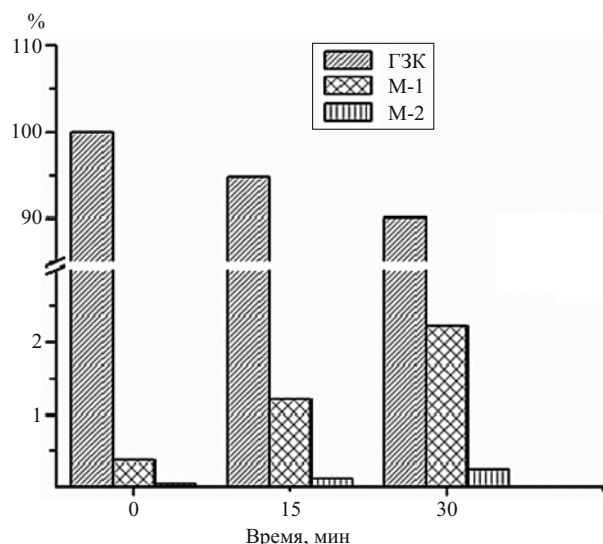


Рис. 1. Динамика количества ГЗК-111 и его метаболитов (М-1 и М-2) в условиях инкубации с микросомальной фракцией печени мышей (ось ординат — % от количества ГЗК-111 в нулевой точке).

микросомальной фракции составляла 0,25 мг/мл; концентрация изучаемого соединения 1 мкМ; НАДФН — 2 мМ; ДМСО — 0,05 %. В качестве референсного соединения использовали пропранолол [9]. В качестве отрицательного контроля (изучение стабильности в фосфатном буфере) ГЗК-111 и пропранолол инкубировали без микросомальной фракции и НАДФН в течение 0 и 30 мин.

In vivo исследование проводили 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 3.11.2016 г. № 81 “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств”.

Изучение фармакокинетики ГЗК-111 и его основных метаболитов проводили после однократного внутривенного введения (в/ж) ФВ в дозе 20 мг/кг в 1 % крахмальном клейстере.

Содержание ГЗК-111 и метаболитов М-1, М-2, М-3 и М-4 определяли в плазме крови до введения исследуемого ФВ (контроль) и через 0,08, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 и 4,0 ч после введения. Образцы крови получали после декапитации животных. Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены в соответствии с нормативной документацией (ГОСТ 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 аналитов в буферном растворе и плазме крови животных использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием. ГЗК-111, пропранолол, М-1 и М-4 регистрировали в режиме положительных ионов работы масс-спектрометра; М-2 и М-3 — в режиме отрицательных ионов. Нижний предел количественного определения составил 1 нг/мл для ГЗК-111 и его метаболитов [3].

Расчёт фармакокинетических (ФК) параметров исследуемых соединений проводили немодельным методом. ФК-кривые (“концентрация лекарственного вещества/метаболита — время”) были построены по усреднённым значениям концентраций ГЗК-111 и его метаболитов М-1, М-2 и М-4 в плазме крови в дискретные интервалы времени, полученным у 5 животных в каждый временной интервал.

Основные расчётные ФК-параметры: AUC_{0-t} — 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. AUC_M/AUC_P — степень превращения ГЗК-111 в метаболит [5].

Оценку уровней экзогенного ЦППГ и фенилуксусной кислоты проводили после вычитания эндогенных уровней, полученных после усреднения концентраций в 5 контрольных образцах плазмы крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 1 этапе исследования изучена стабильность соединения ГЗК-111 в фосфатном буфере. Для этого ГЗК-111 и пропранолол инкубировали без микросомальной фракции и НАДФН в течение 0 и 30 мин. Установлено, что дипептид стабилен в течение изучаемого периода времени в используемых растворах. Полученные данные служили отрицательным контролем.

В то же время ФВ с молекулярными ионами m/z 134 и 154, соответствующими соединениям М-3 и М-4, обнаруживались в пробах через 15 и 30 мин инкубации, однако они присутствовали также и в контрольных пробах, причём их количество не изменялось во времени. Учитывая это обстоятельство, дальнейшие расчёты, связанные с М-3 и М-4, не проводили.

Количество соединений М-1 и М-2 в пробах после 15 и 30 мин инкубации было выше, по сравнению с пробами нулевой точки (0 мин) и пробами отрицательного контроля. Таким образом, можно заключить, что наиболее вероятными метаболитами ГЗК-111 после его инкубации с микросомальной фракцией в течение 30 мин являются соединения М-1 и М-2.

Данные, полученные в результате изучения метаболической стабильности ГЗК-111 в условиях инкубации с микросомальной фракцией мышинной печени, представлены на рис. 1.

Из рис. 1 следует, что уже через 15 мин инкубации содержание ГЗК-111 в микросомальной фракции составило 94,9 % и через 30 мин — 90,1 % от исходного уровня, что говорит о превращении дипептида в продукты биотрансформации. При этом содержание метаболитов росло со временем инкубации. Так, через 15 мин содержание соединения М-1 в микросомальной фракции составило 1,21 % и через 30 мин — 2,23 %. Для М-2 — 0,12 и 0,15 %, соответственно.

Методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии изучен метаболизм соединения ГЗК-111. Обнаружено 4 продукта биотрансформации. Сделано заключение о том, что основными путями биотрансформации ГЗК-111 является образование М-1 в результате гидролиза сложноэфирной связи эстеразами с последующей деградацией этого метаболита до М-2, а также реакции, приводящие к образованию фенилуксусной кислоты и ЦПГ [3]. В то же время ранее в работе С. С. Бойко и соавт. [1] описана ФК и метаболизм ноопепта — этилового эфира *N*-фенилацетил-L-пролилглицина, отличающе-

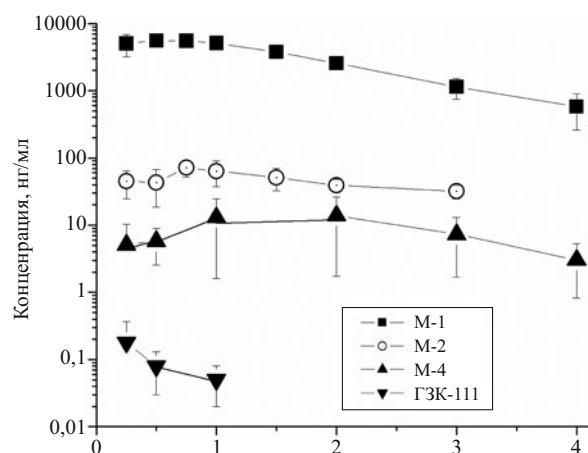


Рис. 2. Фармакокинетические профили ГЗК-111 и метаболитов М-1, М-2 и М-4 в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения ГЗК-111 в дозе 20 мг/кг ($n = 5$; среднее \pm стандартное отклонение).

гося от ГЗК-111 последовательностью аминокислот. Показано, что ноопепт в организме крыс подвергается интенсивной биотрансформации с образованием метаболитов, содержание которых во много раз превышает уровни неизмененного ФВ.

Таблица 1. Объекты исследования

Обозначение	Структурная формула	Химическое название	Молекулярная масса, а.е.м.
ГЗК-111		Этиловый эфир <i>N</i> -фенилацетилглицил-L-пролина	318
М-1		<i>N</i> -Фенилацетилглицил-L-пролин	290
М-2		<i>N</i> -Фенилацетилглицин	191
М-3		Фенилуксусная кислота	134
М-4		Цикло-L-пролилглицин	154

Таблица 2. Фармакокинетические параметры ГЗК-111 и его метаболитов в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения ГЗК-111 в дозе 20 мг/кг

Соединение	AUC_{0-1} , нг/мл · ч	AUC_{0-t} , нг/мл · ч	T_{max} , ч	C_{max} , нг/мл	k_{el} , ч ⁻¹	$t_{1/2el}$, ч	MRT , ч	AUC_M/AUC_P^*
ГЗК-111	0,10	0,10	0,25	0,18	1,5982	0,4	0,7	-
М-1	4658,64	11177,25	0,50	5568,75	0,6844	1,0	1,7	46586
М-2	47,42	134,44	0,75	71,46	0,3676	1,9	3,5	474
М-4	6,70	36,42	0,25	27,13	0,5014	1,4	2,4	67

Примечание: * — оценку степени превращения ГЗК-111 в метаболит проводили, исходя из значений AUC_{0-1} исследуемых веществ, поскольку последнюю значимую концентрацию ГЗК-111 в плазме крови удалось зарегистрировать через 1,0 ч после введения.

В настоящем исследовании концентрации метаболита М-3 во всех экспериментальных образцах не намного превышали фоновые уровни, поэтому рассчитывать ФК-параметры не представлялось возможным.

Усреднённые ФК-профили исходного соединения и его метаболитов М-1, М-2 и М-4 в плазме крови крыс после однократного в/ж-введения представлены на рис. 2, а в табл. 2 — соответствующие им ФК-параметры. Поскольку ФК-кривые построены по средним значениям, при расчётах ФК-параметров отсутствует статистическая обработка результатов.

Из рис. 2 видно, что кинетика анализируемых веществ подчиняется кинетике первого порядка, поскольку снижение концентрации ГЗК-111 в плазме крови крыс имеет монофазный характер. Концентрацию исследуемого ФВ удалось отследить на протяжении 1 ч эксперимента. T_{max} ГЗК-111 составило 0,25 ч, C_{max} — 0,18 нг/мл. Величины AUC_{0-1} и AUC_{0-t} составили 0,10 нг/мл · ч (табл. 2).

Анализ ФК-параметров, характеризующих элиминацию изучаемого соединения, позволяет заключить, что ГЗК-111 быстро выводится из организма животных: $t_{1/2el}$ составил 0,4 ч, MRT — 0,7 ч (табл. 2). Таким образом, ГЗК-111 можно отнести к группе “короткоживущих” ФВ.

Фармакокинетика метаболитов М-1, М-2 и М-4 существенно отличалась от кинетики исходного соединения, прежде всего, высокими концентрациями и, как следствие, значениями площадей под ФК-кривыми (табл. 2).

Метаболит М-1 определялся в плазме крови животных в течение 4,0 ч. T_{max} М-1 отмечали через 0,5 ч после введения ГЗК-111, при этом величина его C_{max} в 31000 раз превышала таковую для неизменного соединения. М-1 в 2,4 раза медленнее выводился из организма крыс в сравнении с исходным соединением. $t_{1/2el}$ М-1 составил 1,0 ч и MRT — 1,7 ч.

Метаболит М-2 определялся в плазме крови животных в течение 3,0 ч, C_{max} метаболита М-2 определялась через 0,75 ч после введения исходного соединения. C_{max} составила 71,46 нг/мл, что в 397 раз больше аналогичной величины, полученной для ГЗК-111. $t_{1/2el}$ М-2 составил 1,9 ч и MRT — 3,5 ч.

Метаболит М-4 определялся в плазме крови в течение 4,0 ч. T_{max} ЦПГ составило 0,25. C_{max} —

27,13 нг/мл, что в 151 раз выше аналогичного параметра неизменного соединения. Установлено, что ЦПГ в 3,0–3,5 раза дольше выводится из организма животных в сравнении с ГЗК-111, на что указывают величины $t_{1/2el}$ и MRT (табл. 2).

Для метаболитов М-1, М-2 и М-4 рассчитаны величины степени превращения соединения ГЗК-111 в соответствующий метаболит, которые составили 46586, 474 и 67 соответственно. Данный параметр для метаболита М-1 был почти в 100 раз выше, чем для метаболита М-2, и почти в 700 раз выше, чем для метаболита М-4. Исходя из полученных данных, можно предположить, что в случае наличия у М-1 и М-2 нейротропной активности данные вещества наряду с ЦПГ обеспечивают наблюдаемый фармакологический эффект.

Данные о биотрансформации ГЗК-111, полученные в опытах *in vitro*, подтверждаются результатами исследования ФК на крысах. Установлено, что биотрансформация соединения ГЗК-111 *in vivo* заключается в образовании *N*-фенилацетилглицил-L-пролина (М-1) с последующей деградацией этого метаболита до *N*-фенилацетилглицина (М-2). В опытах на животных также обнаружен циклопролилглицин (М-4).

ВЫВОДЫ

1. В опытах *in vitro* с микросомальной фракцией печени мышей обнаружены два продукта биотрансформации ГЗК-111 — *N*-фенилацетилглицил-L-пролин (М-1) и *N*-фенилацетилглицин (М-2).
2. На крысах показано, что основное направление биотрансформации ГЗК-111 заключается в образовании М-1 с последующей деградацией этого метаболита до М-2.
3. Степень превращения дипептида в метаболиты снижалась в ряду: М-1, М-2, М-4.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. С. Бойко, В. П. Жердев, А. А. Дворянинов и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **60**(2), 53–55 (1997).
2. 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.
3. Г. Б. Колыванов, П. О. Бочков, А. А. Литвин и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **172**(11), 618–621 (2021); doi: 10.47056/0365-9615-2021-172-11-618-621.

4. 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.
5. *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 К, Москва (2013).
6. С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, К. Н. Колясникова и др., Патент РФ 2646604, Бюл. № 7 (2018).
7. P. Baranczewski, A. Stańczak, K. Sundberg, et al., *Pharmacol. Rep.*, **58**(4), 453 – 472 (2006).
8. K. N. Koliashnikova, P. Yu. Povarnina, A. V. Talerova, et al., Glyproline Pro-Ampakine with neuroprotective activity, in: *Neuroprotection — New Approaches and Prospects*, Matilde Otero-Losada, Francisco Capani and Santiago Perez Lloret, IntechOpen; doi: 10.5772 / intechopen.91192. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/71098>.
9. R. S. Obach, *Drug Metab. Dispos.*, **27**(11), 1350 – 1359 (1999).

Поступила 11.05.22

IN VITRO METABOLIC STABILITY AND PHARMACOKINETICS OF MAIN METABOLITES OF *N*-PHENYLACETYLGLYCYL-L-PROLINE ETHYL ETHER (GZK-111) IN RATS

O. Yu. Kravtsova^{1,*}, A. L. Podol'ko¹, P. O. Bochkov¹, A. A. Litvin¹, G. B. Kolyvanov¹, S. S. Boiko¹, and V. P. Zherdev¹

¹ Research Zakusov Institute of Pharmacology, Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

* e-mail: mojaevdim@mail.ru

Metabolic stability of the new neuroprotector GZK-111 (ethyl ether of *N*-phenylacetylglucyl-L-proline) was studied under incubation with the microsomal fraction of mice liver. The pharmacokinetic parameters of the main metabolites of GZK-111 in the blood plasma of rats were determined after its single intragastric administration. *In vitro* experiments revealed two products of GSK-111 biotransformation: *N*-phenylacetylglucyl-L-proline (M-1) and *N*-phenylacetylglucine (M-2). The study showed that the main pathways of GZK-111 biotransformation consisted in the formation of M-1 with subsequent degradation to M-2, as well as in the formation of a cyclic derivative cyclopropylglycine (M-4). The degree of dipeptide conversion into metabolites *in vivo* decreased in the series M-1, M-2, M-4.

Keywords: neuroprotector; GZK-111; *in vivo/in vitro* metabolism; HPLC-mass spectrometry.