

Фармакокинетика нового антиагреганта – производного индолинона в эксперименте

В.В. Быков^{1,2}, А.В. Быкова¹, К.А. Леонов¹, А.И. Венгеровский², В.В. Удут³

¹ООО «Инновационные фармакологические разработки», Томск, Россия

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

³НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия

АННОТАЦИЯ

Введение. От осложнений (наиболее частые из них – тромбозы мозговых, коронарных и периферических сосудов), вызванных заболеваниями сердечно-сосудистой системы, ежегодно умирает более 18 млн чел. Для оптимальной профилактики тромбозов в рамках адекватной антитромботической терапии рационально применять лекарственные средства, способные эффективно предупреждать образование тромбов без опасности развития кровотечений. Новое производное индолинона (шифр – GRS) оказывает выраженное антиагрегантное действие и обладает низкой токсичностью (LD_{50} для крыс > 5000 мг/кг). Понимание особенностей фармакокинетики соединения GRS при внутривенном и внутрижелудочном введении необходимо для определения эффективных доз и режима назначения.

Цель. Определить особенности фармакокинетики нового антиагреганта – производного индолинона (GRS) при его однократном внутривенном и внутрижелудочном введении крысам.

Материалы и методы. Соединение GRS вводили в хвостовую вену в дозе 1 мг/кг в водном растворе или внутрижелудочно в дозе 10 мг/кг в виде суспензии в водном растворе карбоксиметилцеллюлозы. После введения забирали образцы крови через 5, 10, 20, 40 мин, 1, 2, 4 и 8 ч и мочи через 2, 4, 8, 12 и 24 ч. Содержание соединения GRS в биологических образцах измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием.

Результаты. Установлено, что вне зависимости от способа введения GRS его антиагрегантный эффект проявляется в течение не менее 8 ч, при этом липофильное соединение пассивной диффузией быстро распределяется в органах и тканях, подвергается биотрансформации и выводится с мочой преимущественно в виде метаболитов, доказательством чего является выведение с мочой в неизмененном виде не более 2.5 %. Биодоступность GRS не превышает 12 %.

Заключение. Соединение GRS при введении в вену и желудок крысам выводится с мочой преимущественно в виде метаболитов, метаболический клиренс более выражен при внутрижелудочном введении GRS.

Ключевые слова: производное индолинона, экскреция с мочой.

Образец цитирования: Быков В.В., Быкова А.В., Леонов К.А., Венгеровский А.И., Удут В.В. Фармакокинетика нового антиагреганта – производного индолинона в эксперименте // Journal of Siberian Medical Sciences. 2022;6(4):77-86. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-4-77-86

Pharmacokinetics of a new antiplatelet agent, an indolinone derivative in the experiment

V.V. Bykov^{1,2}, A.V. Bykova¹, K.A. Leonov¹, A.I. Vengerovskii², V.V. Udut³

¹Innovative Pharmacological Research, LLC, Tomsk, Russia

²Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia

ABSTRACT

Introduction. More than 18 million people die every year from complications (the most common of them are thrombosis of the cerebral, coronary and peripheral vessels) caused by diseases of the cardiovascular system. Optimal

Поступила в редакцию 06.04.2022
Прошла рецензирование 26.04.2022
Принята к публикации 17.05.2022

Автор, ответственный за переписку
Быков Владимир Валерьевич: ООО «Инновационные фармакологические разработки», 634021, г. Томск, ул. Елизаровых, 79/4.
E-mail: vladimir.b.1989@gmail.com

Received 06.04.2022
Revised 26.04.2022
Accepted 17.05.2022

Corresponding author
Vladimir V. Bykov: Innovative Pharmacological Research, LLC, 79/4, Elizarovich str., Tomsk, 634021, Russia.
E-mail: vladimir.b.1989@gmail.com

prevention of thrombosis (antiplatelet therapy) requires the use of drugs that would be able to effectively prevent thrombus formation without increasing the risk of bleeding. A new indolinone derivative (codenamed GRS) has potent antiaggregant action and low toxicity (LD_{50} for rats > 5000 mg/kg). However, selecting the effective dose and dosage regimen for GRS requires data on its pharmacokinetics in oral and intravenous administration.

A i m . To determine the pharmacokinetics of a new antiplatelet agent, an indolinone derivative (GRS) after a single intravenous and oral administration to rats.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . The GRS compound was administered as a 1 mg/kg aqueous solution into the tail vein or as a 10 mg/kg suspension in carboxymethyl cellulose aqueous solution for oral (intra-gastric) administration. Blood samples were taken at 5, 10, 20, 40 min, 1, 2, 4, and 8 h, and urine samples were collected at 2, 4, 8, 12, and 24 h after administration. GRS was detected in biological samples using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection.

R e s u l t s . The study has demonstrated that with both routes of administration, the antiaggregant effect of GRS lasts for at least 8 hours, being lipophilic, GRS is rapidly distributed in organs and tissues by passive diffusion, undergoes biotransformation and is excreted in the urine mostly as metabolites, since at most 2.5% of the initial compound is excreted in the urine. Bioavailability of GRS does not exceed 12%.

C o n c l u s i o n . After intravenous and oral administration to rats, the GRS compound is excreted in the urine mostly as metabolites; metabolic clearance is more prominent after GRS oral administration.

Keywords: indolinone derivative, urinary excretion.

Citation example: Bykov V.V., Bykova A.V., Leonov K.A., Vengerovskii A.I., Udut V.V. Pharmacokinetics of a new antiplatelet agent, an indolinone derivative in the experiment. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022;6(4):77-86. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-4-77-86

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются главной причиной смертности во всем мире, от их осложнений ежегодно умирает более 18 млн чел. Наиболее часты такие осложнения, как тромбоз мозговых, коронарных и периферических сосудов [1]. Для оптимальной профилактики тромбозов в рамках адекватной антитромботической терапии рационально применять лекарственные средства, способные эффективно предупреждать образование тромбов без опасности развития кровотечений. Среди антитромботических средств этому требованию в наибольшей степени удовлетворяют антиагреганты [2–6].

Новое производное индолинона (шифр – GRS) оказывает выраженное антиагрегантное действие и обладает низкой токсичностью (LD_{50} для крыс > 5000 мг/кг). В тромбоцитах соединение GRS стимулирует цитозольную растворимую гуанилатциклазу и увеличивает синтез циклического гуанозинмонофосфата. Этот вторичный мессенджер вызывает депонирование ионов кальция в гранулах тромбоцитов и устраняет активирующее влияние Ca^{2+} на связывание фибриногена с гликопротеиновыми рецепторами IIb/IIIa. В результате тормозится агрегация тромбоцитов [7].

Понимание особенностей фармакокинетики соединения GRS при внутривенном и внутрижелудочном введении необходимо для определения эффективных доз и режима назначения.

INTRODUCTION

Diseases of the cardiovascular system are the main cause of death worldwide, more than 18 million people die every year from their complications. The most common complications are thrombosis of cerebral, coronary and peripheral vessels [1]. For optimal prevention of thrombosis (antiplatelet therapy), it is rational to use drugs that can effectively prevent thrombus formation without the risk of bleeding. Among antithrombotic agents, antiaggregants meet this requirement to the greatest extent [2–6].

A new indolinone derivative (codenamed GRS) has a pronounced antiplatelet effect and low toxicity (LD_{50} for rats > 5000 mg/kg). In platelets, the GRS compound stimulates cytosolic soluble guanylate cyclase and increases the synthesis of cyclic guanosine monophosphate. This second messenger causes the deposition of calcium ions in platelet granules and eliminates the activating effect of Ca^{2+} on fibrinogen binding to glycoprotein IIb/IIIa receptors. As a result, platelet aggregation is inhibited [7].

Understanding the pharmacokinetics of the GRS compound in intravenous and oral administration is necessary to determine the effective dose and dosage regimen.

AIM OF THE RESEARCH

To determine the pharmacokinetics of a new indolinone derivative with antiplatelet action (GRS) after a single intravenous and oral administration to rats.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить особенности фармакокинетики нового производного индолинона с антиагрегантным действием (GRS) при однократном внутривенном и внутрижелудочном введении крысам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Производное индолинона GRS представляет собой (2-[2-[(5RS)-5-(гидроксиметил)-3-метил-1,3-оксазolidин-2-илиден]-2-цианоэтилиден]-1H-индол-3(2H)-он) (рис. 1).

Эксперименты проводили в испытательном центре ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ИЦ) на 90 крысах-самцах линии Sprague Dawley массой тела 250 ± 10 г. Животных получали из отделения лабораторных животных ИЦ, содержали в стандартных пластиковых клетках по 5 крыс при температуре $18-26^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 45–65 %, воздухообмене 15 объемов/ч и регулируемом световом режиме (12:12 ч). Исследование одобрено этическими комитетами ООО «Инновационные фармакологические разработки» (протокол от 21.03.2019 № 06/2019) и Сибирского государственного медицинского университета (протокол от 24.10.2016 № 5378), проведено в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите лабораторных животных (Страсбург, 1986) с соблюдением принципов и правил надлежащей лабораторной практики (Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 и ГОСТ 33044-2014).

Производное индолинона GRS вводили крысам однократно: в хвостовую вену в водном растворе (0.5 мл) в дозе 1 мг/кг или внутрижелудочно в виде суспензии в 0.5% водном растворе карбоксиметилцеллюлозы (1 мл) в дозе 10 мг/кг. Дозы соединения GRS являются эффективными терапевтическими (ED_{50}) при разных путях введения, большая доза для приема внутрь обусловлена низкой биодоступностью вещества [7].

MATERIALS AND METHODS

The indolinone derivative GRS is (2-[2-[(5RS)-5-(hydroxymethyl)-3-methyl-1,3-oxazolidin-2-ylidene]-2-cyanoethylidene]-1H-indole-3(2H)-on) (Fig. 1).

The experiments were carried out at the Research & Development Center of the Innovative Pharmacological Research, LLC (IPHAR, LLC) on 90 male Sprague Dawley rats weighing 250 ± 10 g. The rats were obtained from the Animal Facilities of the IPHAR, kept in plastic cages of 5 rats at a temperature of $18-26^\circ\text{C}$, environmental relative humidity of 45–65%, air exchange rate of 15 vol./h and adjustable light mode (12:12 h). The study was approved by the local ethic committees of IPHAR, LLC (No. 06/2019 dated 21.03.2019), and the Siberian State Medical University (Protocol No. 5378 dated 24.10.2016); it was conducted in accordance with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), and in compliance with the principles and rules of Good Laboratory Practice (Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission No. 81 of November 3, 2016, and GOST 33044-2014).

The indolinone derivative GRS was administered to rats once: into the tail vein as a 1 mg/kg aqueous solution (0.5 ml) or orally (intragastrically) as a 10 mg/kg suspension in a 0.5% carboxymethyl cellulose aqueous solution (1 ml). Doses of the GRS compound are effective therapeutic (ED_{50}) for different routes of administration; the high dose for oral administration is due to the low bioavailability of the substance [7]. The animals were divided into 4 groups: in the 1st and 2nd groups (40 animals each), after intravenous or oral administration, under light anesthesia with sevoflurane, blood samples were taken from the cardiac cavity after 5, 10, 20, 40 min, 1, 2, 4 and 8 h (from 5 animals at one time point). In the 3rd and 4th groups (5 animals in each), urine was collected after 2, 4, 8, 12 and 24 h. The blood was stabilized with heparin sodium (50 U/ml), plasma was obtained by centrifugation at

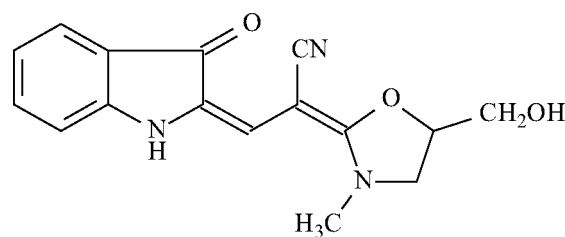


Рис. 1. Структурная формула GRS
Fig. 1. The structural formula of GRS

Животные были разделены на 4 группы: в 1-й и 2-й группе (40 животных в каждой) после внутривенного или внутрижелудочного введения, под легким наркозом севофлураном, забирали кровь из полости сердца через 5, 10, 20, 40 мин, 1, 2, 4 и 8 ч (у 5 особей в одной временной точке). В 3-й и 4-й группе (5 животных в каждой) собирали мочу через 2, 4, 8, 12 и 24 ч. Кровь стабилизировали гепарином натрия (50 ЕД/мл), плазму получали центрифугированием при 1500 g. Для получения достаточного количества мочи за 2 ч до ее сбора животным внутрижелудочно вводили 5 мл дистиллированной воды. Мочу собирали с помощью метаболических камер (OpenScience, Россия).

Образцы плазмы и мочи хранили в морозильной камере при -70°C . Концентрацию соединения GRS определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе «Миличром А-02» с ультрафиолетовым (УФ) спектрофотометрическим детектором (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия). Анализ проводили на колонке размером 75×2 мм, заполненной сорбентом ProntoSil-120-5-C18 AQ (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия) с диаметром частиц 5 мкм. Биологические образцы в процессе экстракции перемешивали на лабораторном медицинском шейкере Vortex V-3 (ELMI Ltd, Латвия). Водно-органическую фазу образцов осаждали в центрифуге Biofuge pico (Heraeus Group GmbH, Германия), органический растворитель упаривали в вакуумном концентраторе UniEquip 100 ECH (UniEquip, Германия). Для извлечения соединения GRS применяли метод QuEChERS, основанный на жидкостной экстракции ацетонитрилом.

ВЭЖХ-анализ проводили при следующих условиях:

- подвижная фаза А – 0.01 М раствор аммония ацетата (рН 4.0);
- подвижная фаза Б – метанол;
- скорость потока элюента – 0.15 мл/мин;
- температура колонки – 35°C ;
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- длина волны УФ-детектора – 360 нм;
- режим элюирования – градиентный.

Хроматограммы обрабатывали с помощью программного обеспечения «МультиХром» (ЗАО «Амперсанд», Россия). Разработанные методики валидировали согласно требованиям [8, 9]. Метрологические характеристики рассчитывали согласно [10].

На основании полученных концентраций строили фармакокинетические профили соединения GRS в плазме и определяли зависимость

1500 g. To obtain a sufficient amount of urine, 5 ml of distilled water was administered intragastrically 2 h before sampling. Urine was collected using metabolic cage (OpenScience, Russia).

Plasma and urine samples were stored in a freezer at -70°C . The concentration of the GRS compound was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a MiLiChrom A-02 chromatograph with an ultraviolet (UV) spectrophotometric detector (Institute of Chromatography, EcoNova, LLC, Russia). The analysis was performed using a 75×2 mm column filled with a ProntoSil-120-5-C18 AQ sorbent with a particle diameter of 5 μm (Institute of Chromatography, EcoNova, LLC, Russia). In the process of extraction, biological samples were mixed on a Vortex V-3 laboratory medical shaker (ELMI Ltd., Latvia). The aqueous organic phase of the samples was precipitated in a Biofuge pico centrifuge (Heraeus Group GmbH, Germany), the organic solvent was evaporated in a UniEquip 100 ECH vacuum concentrator (UniEquip GmbH, Germany). To extract the GRS compound, the QuEChERS technique was used, based on liquid extraction with acetonitrile.

HPLC was performed under the following conditions:

- mobile phase A – 0.01 M ammonium acetate solution (pH 4.0);
- mobile phase B – methanol;
- eluent flow rate – 0.15 ml/min;
- column temperature – 35°C ;
- volume of a sample – 20 μl ;
- UV detector wavelength – 360 nm;
- elution mode – gradient.

Chromatograms were processed using the MultiChrom software (Ampersand Ltd., Russia). The developed technique was validated according to the requirements [8, 9]. Metrological characteristics were calculated according to [10].

Based on the concentration values obtained, pharmacokinetic profiles of the GRS compound in plasma were made, and the dependence of the amount of GRS excreted in the urine on the administered dose was determined. The pharmacokinetic parameters were calculated and the results were processed using the Microsoft Excel and Statistica 8.0 software package. The normality of data distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test. The normal distribution was revealed; therefore, the significance of differences ($p < 0.05$) in the groups of animals was determined using Student's *t*-test. For all pharmacokinetic parameters, the mean value and standard error of the mean were calculated [11].

выведенного с мочой количества GRS от введенной дозы. Для расчета фармакокинетических параметров и статистической обработки результатов применяли пакет программ Microsoft Excel и Statistica 8.0. Нормальность распределения данных оценивали по критерию Шапиро – Уилка. Выявлено нормальное распределение, поэтому достоверность различий ($p < 0.05$) показателей в группах животных устанавливали по t -критерию Стьюдента. Для всех фармакокинетических параметров рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку среднего [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При внутривенном введении соединения GRS имеет большой объем распределения (0.67 л) за счет поступления в органы и ткани и накопления в форменных элементах крови (коэффициент распределения цельная кровь/плазма составляет 1.6). При высоком общем клиренсе (1.33 л/ч) соединения GRS доля почечного клиренса не превышает 2.5 %. Действительно, для производных индолинона почечный путь экскреции является минорным [12]. При этом соединение GRS плохо проникает в ткань почек, где коэффициент его тканевой доступности f_t составляет всего 0.43 ± 0.06 [13]. Период полуэлиминации соединения GRS короткий – 0.35 ч (табл. 1). Так, его начальная концентрация в плазме – около 962 нг/мл в первые 20 мин уменьшалась почти в 10 раз, до 99.17 нг/мл, а через 4 ч вещество GRS в плазме не определялось (нижний предел количе-

RESULTS AND DISCUSSION

With intravenous administration, the GRS compound has a large volume of distribution (0.67 l) due to its entry into organs and tissues, and accumulation in blood cells (whole blood/plasma distribution coefficient is 1.6). With a high total clearance (1.33 l/h) of the GRS compound, the proportion of renal clearance does not exceed 2.5%. Indeed, for indolinone derivatives, the renal route of excretion is minor [12]. At the same time, the GRS compound poorly penetrates into renal tissue, so its tissue availability f_t is only 0.43 ± 0.06 [13]. The half-life of the GRS compound is short, 0.35 h (Table 1). Thus, its initial plasma concentration is about 962 ng/ml, in the first 20 min decreased by almost 10 times, to 99.17 ng/ml, and after 4 h the GRS substance was not detected in plasma (the lower limit of quantification of the analytical method was 10 ng/ml). The mean retention time (MRT) of the GRS compound in plasma was 0.94 h (Fig. 2).

Bioavailability of the indolinone derivative with oral administration to rats is only 11–12% due to presystemic elimination during the first passing through the small intestine and the liver. Its maximum plasma concentration (150.2 ng/ml) was reached after 30 min; after 8 h, the compound was sensibly undetectable in plasma (see Fig. 2). With oral administration, the GRS compound has a significantly larger volume of distribution (26.53 l) and total clearance (11.93 l/h) than with intravenous administration (see Table 1). In addition, the volume of GRS distribution significantly exceeds the

Таблица 1. Фармакокинетические показатели производного индолинона GRS при однократном внутривенном и внутрижелудочном введении крысам

Table 1. The pharmacokinetic parameters of the indolinone derivative GRS after a single intravenous and oral administration to rats

Параметр / Parameter	Внутривенное введение Intravenous administration	Внутрижелудочное введение Oral administration
Доза, мг/кг Dose, mg/kg	1	10
Объем распределения, л / Volume of distribution, l	0.67 ± 0.29	$26.53 \pm 9.47^*$
Период полуэлиминации ($T_{1/2}$), ч / Half-life ($T_{1/2}$), h	0.35 ± 0.07	$1.45 \pm 0.44^*$
Общий клиренс, л/ч Total clearance, l/h	1.33 ± 0.89	$11.93 \pm 5.66^*$
Почечный клиренс, л/ч Renal clearance, l/h	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.06
Почечный клиренс, % / Renal clearance, %	2.49 ± 0.51	$0.68 \pm 0.22^*$
Среднее время удержания в плазме, ч Mean retention time in plasma, h	0.94 ± 0.05	$1.34 \pm 0.11^*$
Абсолютная биодоступность, % / Absolute bioavailability, %	100	11.1 ± 2.6
Связь с белками плазмы, % / Plasma proteins bindings, %	55.1 ± 1.0	55.1 ± 1.0

* Статистически значимые отличия от показателя при внутривенном введении соединения GRS ($p < 0.05$).
Significant differences from intravenous administration of the GRS compound ($p < 0.05$).

ственного определения аналитической методики – 10 нг/мл). Среднее время удержания соединения GRS в плазме (MRT) – 0.94 ч (рис. 2).

Биодоступность производного индолинона при внутрижелудочном введении крысам составляет всего 11–12 % вследствие пресистемной элиминации при первом пассаже через тонкий кишечник и печень. Его максимальная концентрация в плазме (150.2 нг/мл) достигалась через 30 мин, спустя 8 ч соединение в плазме практически не определялось (см. рис. 2). При внутрижелудочном введении соединение GRS имеет значительно большие, чем при внутривенном введении, объем распределения (26.53 л) и общий клиренс (11.93 л/ч) (см. табл. 1). Кроме того, объем распределения GRS значительно превышает объем всех жидких сред организма крысы, а его общий клиренс в 5.6 раза выше скорости печеночного кровотока [14]. Это объясняется значительным распределением и депонированием GRS в органах и тканях [13], и, вероятно, интенсивной ферментативной инактивацией в печени. Длительный период полуэлиминации (1.45 ч) и продолжительное удержание в плазме (1.34 ч) при внутрижелудочном введении являются следствием медленного поступления соединения GRS в кровь в процессе всасывания из кишечника и перераспределения из тканей.

Доля почечного клиренса соединения GRS при внутрижелудочном введении в 3.7 раза ниже, чем при внутривенном введении. Очевидно, большее количество молекул выводится с мочой

volume of all liquid media of the rat body, and its total clearance is 5.6 times higher than the liver blood flow rate [14]. This is due to the significant distribution and accumulation of GRS in organs and tissues [13], and probably, due to an intensive enzymatic inactivation in the liver. A long half-life (1.45 h) and prolonged retention in plasma (1.34 h) with oral administration are a consequence of the slow entering of the GRS compound into the bloodstream upon absorption from the intestine and redistribution from tissues.

The proportion of renal clearance of the GRS compound in oral administration is 3.7 times lower than with intravenous administration. Obviously, more molecules are excreted in the urine unchanged when administered intravenously than when administered orally.

The GRS compound is completely eliminated from the body in 8 and 12 h with intravenous and oral administration, respectively (see Table 2), cumulative excretion of GRS with oral administration is insignificant, and does not exceed 1%. Previously, an experiment *in vitro* showed that the GRS compound after 10-min incubation with platelets of rats reduced their ability to aggregate by 40% [7], such systemic exposure of GRS in plasma is sufficient for a persistent antiplatelet effect without the risk of bleeding. The antiplatelet effect after a single oral administration of the GRS compound lasts for 8 h.

$\log (C_o/C_w)$ (C_o and C_w are concentrations of a substance in the *n*-octanol and water phases, respectively) of the GRS indolinone derivative in the *n*-octanol-water system is 0.9, which indicates its lipophilic

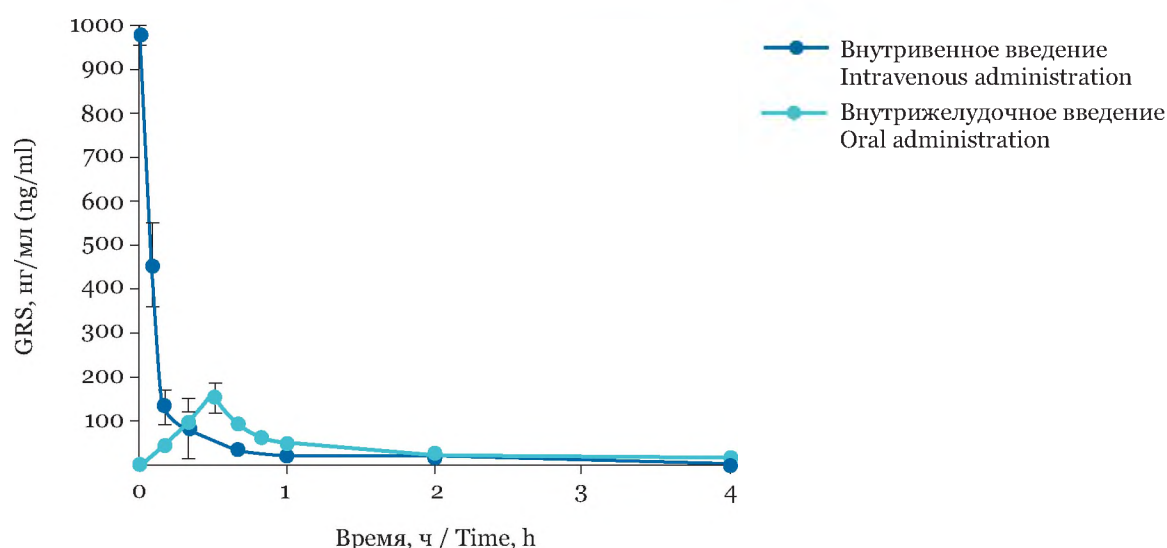


Рис. 2. Фармакокинетический профиль соединения GRS в плазме крыс после однократного внутривенного введения в дозе 1 мг/кг и внутрижелудочного введения в дозе 10 мг/кг
Fig. 2. The pharmacokinetic profile of the GRS compound in rat plasma after a single intravenous administration at a dose of 1 mg/kg and oral administration at a dose of 10 mg/kg

в неизмененном виде при внутривенном введении, чем при внутрижелудочном введении.

Соединение GRS полностью элиминируется из организма за 8 и 12 ч при внутривенном и внутрижелудочном введении соответственно (табл. 2), кумулятивная экскреция GRS при внутрижелудочном введении незначительная, не превышает 1 %. Ранее в опыте *in vitro* было показано, что соединение GRS после 10-минутной инкубации с тромбоцитами крыс снижало их способность к агрегации на 40 % [7], такой системной экспозиции GRS в плазме достаточно для стойкого антиагрегантного эффекта без опасности развития кровотечения. Антиагрегантное действие после однократного внутрижелудочного введения соединения GRS сохраняется на протяжении 8 ч.

Показатель $\text{Log } (C_o/C_p)$ (C_o и C_p – равновесные концентрации вещества в *n*-октанольной и водной фазе соответственно) производного индолинона GRS в системе *n*-октанол – вода составляет 0,9, что указывает на его липофильную природу. Низкие кумулятивная экскреция и почечный клиренс связаны с активной канальцевой реабсорбцией, характерной для липофильных соединений [15]. Соединение GRS является субстратом гликопротеина P и связывается с белками плазмы на 55,1 % [13], что уменьшает поступление в мочу.

Полученные данные свидетельствуют о незначительном выведении неизмененного соединения GRS почками. Ранее было показано, что его концентрация в печени в 4 раза превышает концентрацию в плазме (коэффициент тканевой доступности f_t 3.87 ± 1.30) [13]. Возможными причинами низкого почечного клиренса соединения GRS являются преимущественное выведение с желчью или экскреция в виде метаболитов.

На хроматограммах мочи животных, получавших GRS, выявлялся дополнительный пик, кроме пика GRS. Скорее всего, дополнительный пик обу-

nature. Low cumulative excretion and renal clearance are associated with active tubular reabsorption characteristic of lipophilic compounds [15]. The GRS compound is a substrate of P-glycoprotein and binds to plasma proteins by 55,1% [13], which reduces urinary excretion.

The data obtained indicate a mild renal excretion of the unchanged GRS compound. Previously, it was shown that its concentration in the liver is 4 times higher than the concentration in plasma (f_t 3.87 ± 1.30) [13]. Possible reasons for the low renal clearance of the GRS compound are predominant biliary excretion or excretion as metabolites.

On the urine chromatograms of animals receiving GRS, an additional peak was detected, except for the GRS peak. Most likely, the additional peak is due to the presence of a metabolite. Judging by the shorter retention time in plasma, the possible metabolite (t_R 10.5 min) has more hydrophilic properties than the GRS compound (t_R 13.1 min).

Thus, the indolinone derivative GRS after a single intravenous and oral administration, being a lipophilic compound, is rapidly distributed by passive diffusion in organs and tissues, undergoes biotransformation in the liver, and is reabsorbed in the renal tubules. With both routes of administration, the GRS compound is excreted in the urine primarily as metabolites.

The GRS compound is an antithrombotic agent capable of reducing platelet aggregation [16]. Its use is planned for the secondary prevention of cardiovascular events in patients who have had myocardial infarction or ischemic stroke. In such patients, renal excretory function is often impaired due to renal failure, congestive heart failure, and increased secretion of antidiuretic hormone [17]. The GRS compound is excreted unchanged in the urine in small amounts, therefore, in cardiovascular diseases, the likelihood of a change in its pharmacokinetics is small, which will not require dose adjustment.

Таблица 2. Доля почечной экскреции соединения GRS в зависимости от времени после введения
Table 2. The proportion of renal excretion of the GRS compound as a function of time after administration

Время, ч / Time, h	Внутривенное введение Intravenous administration		Внутрижелудочное введение Oral administration	
	нг / ng	%	нг / ng	%
0–2	5475 ± 685	88	2325 ± 225	14
2–4	500 ± 160	8	7795 ± 880	48
4–8	249 ± 40	4	4951 ± 540	30
8–12	—	—	1256 ± 191	8
12–24	—	—	—	—
Кумулятивная экскреция, нг Cumulative excretion, ng	6225		16327	

словлен присутствием метаболита. Судя по меньшему времени удержания в плазме, возможный метаболит (tR 10.5 мин) обладает более гидрофильными свойствами, чем соединение GRS (tR 13.1 мин).

Таким образом, производное индолинона GRS после однократного внутривенного и внутривенного введения как липофильное соединение пассивной диффузией быстро распределяется в органах и тканях, подвергается биотрансформации в печени и реабсорбируется в почечных канальцах. При обоих путях введения соединение GRS выводится с мочой преимущественно в виде метаболитов.

Соединение GRS является антитромботическим средством, способным снижать агрегацию тромбоцитов [16]. Его применение планируется для вторичной профилактики сердечно-сосудистых событий у больных, перенесших инфаркт миокарда или ишемический инсульт. У таких пациентов часто нарушена выделительная функция почек вследствие почечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, повышенной секреции антидиуретического гормона [17]. Соединение GRS в незначительном количестве выводится в неизмененном виде с мочой, поэтому при сердечно-сосудистых заболеваниях вероятность изменения его фармакокинетики мала, что не потребует коррекции дозы.

Длительная системная экспозиция при внутривенном введении указывает на возможность

Long-term systemic exposure with intravenous administration indicates the possibility of using the indolinone derivative GRS for the relief of acute conditions.

CONCLUSION

The GRS compound, regardless of the route of administration, is excreted in the urine mainly as metabolites; no more than 2.5% of the administered dose is excreted unchanged. Metabolic clearance is more prominent with oral administration of GRS.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

применения производного индолинона GRS для купирования острых состояний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Соединение GRS вне зависимости от пути введения выводится с мочой преимущественно в виде метаболитов, в неизмененном виде выводится не более 2.5 % от введенной дозы. Метаболический клиренс более выражен при внутривенном введении GRS.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения. Вопросы здравоохранения. Сердечно-сосудистые заболевания. URL: https://www.who.int/ru/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1 (дата обращения: 10.10.2022).
2. Попова Л.В., Аксенова М.Б., Хлевчук Т.В. Антиагрегантная терапия в кардиологии // Клин. медицина. 2016;94(10):729-736. DOI: 10.18821/0023-2149-2016-94-10-729-736.
3. Ibanez B., James S., Agewall S. et al., ESC Scientific Document Group. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC) // Eur. Heart J. 2018;39(2):119-177. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx393.
4. Valgimigli M., Bueno H., Byrne R.A. et al., ESC Scientific Document Group, ESC Committee for Practice Guidelines, ESC National Cardiac Societies. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association

REFERENCES

1. World Health Organization. Health topics. Cardiovascular diseases. URL: https://www.who.int/ru/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1 (accessed 10.10.2022).
2. Popova L.V., Aksanova M.B., Khlevchuk T.V. Antiplatelet therapy in cardiology. *Klin. Med.* 2016;94(10):729-736. DOI: 10.18821/0023-2149-2016-94-10-729-736. (In Russ.)
3. Ibanez B., James S., Agewall S. et al., ESC Scientific Document Group. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 2018;39(2):119-177. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx393.
4. Valgimigli M., Bueno H., Byrne R.A. et al., ESC Scientific Document Group, ESC Committee for Practice Guidelines, ESC National Cardiac Societies. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur. Heart*

- for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) // *Eur. Heart J.* 2018;39(3):213-260. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx419.
5. Vandvik P.O., Lincoff A.M., Gore J.M. et al. Primary and secondary prevention of cardiovascular disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines // *Chest.* 2012;141(2):e637S-e668S. DOI: 10.1378/chest.11-2306.
6. Диагностика и лечение фибрилляции предсердий // *Рос. кардиол. журн.* 2013;4S3:5-100. DOI: 10.15829/1560-4071-2013-4S3-5-100.
7. Быков В.В., Чернышева Г.А., Смольякова В.И. и др. Антиагрегантная активность нового производного индолинона // *Эксперимент. и клин. фармакология.* 2019;82(7):10-13. DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-7-10-13.
8. European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation. London, 21 Jul 2011. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (дата обращения: 30.09.2022).
9. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. 2018. 41 p.
10. Рекомендации по межгосударственной стандартизации. РМГ 61.2010. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200094703> (дата обращения: 30.09.2022).
11. Mishra P., Pandey C.M., Singh U., Keshri A., Sabaretnam M. Selection of appropriate statistical methods for data analysis // *Ann. Card. Anaesth.* 2019;22(3):297-301. DOI: 10.4103/aca.ACA_248_18.
12. Ye C., Sweeny D., Sukbuntherng J. et al. Distribution, metabolism, and excretion of the anti-angiogenic compound SU5416 // *Toxicol. In Vitro.* 2006;20(2):154-162. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.047.
13. Bykov V.V., Bykova A.V., Leonov K.A., Vengerovskii A.I., Udut V.V. Distribution and transmembrane transport as the basis of proper pharmacodynamics of an antithrombotic drug – an indolinone derivative // *Res. J. Pharm. Tech.* 2022;15(3):1241-1244. DOI: 10.52711/0974-360X.2022.00207.
14. Gibson C.R., Gleason A., Messina E. Measurement of total liver blood flow in intact anesthetized rats using ultrasound imaging // *Pharmacol. Res. Perspect.* 2021;9(2):e00731. DOI: 10.1002/prp2.731.
15. Fleck C., Bräunlich H. Factors determining the relationship between renal and hepatic excretion of xenobiotics // *Arzneimittelforschung.* 1990;40(8):942-946.
16. Быков В.В., Смольякова В.И., Чернышева Г.А. и др. Влияние нового антитромботического средства GRS – стимулятора растворимой гуанилатциклазы на эндотелиальную дисфункцию у крыс после инфаркта миокарда // *Бюл. эксперимент. биологии и медицины.* 2021; 172(12):707-710. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-12-707-710.
17. Asconapé J.J. Use of antiepileptic drugs in hepatic and renal disease // *Handb. Clin. Neurol.* 2014;119:417-432. DOI: 10.1016/B978-0-7020-4086-3.00027-8.
- J.* 2018;39(3):213-260. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx419.
5. Vandvik P.O., Lincoff A.M., Gore J.M. et al. Primary and secondary prevention of cardiovascular disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2012;141(2):e637S-e668S. DOI: 10.1378/chest.11-2306.
6. Diagnosis and treatment of atrial fibrillation. *Russian Journal of Cardiology.* 2013;4S3:5-100. DOI: 10.15829/1560-4071-2013-4S3-5-100.
7. Bykov V.V., Chernysheva G.A., Smolyakova V.I. et al. Antiplatelet activity of a new indolinone derivative. *Experimental and Clinical Pharmacology,* 2019;82(7):10-13. DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-7-10-13.
8. European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation. London, 21 Jul 2011. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (accessed 30.09.2022).
9. *Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry* (2018). 41 p.
10. Recommendations for interstate standardization. RMG 61.2010. Indicators of accuracy, trueness, precision of methods of quantitative chemical analysis. Assessment Methods. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200094703> (accessed 30.09.2022).
11. Mishra P., Pandey C.M., Singh U., Keshri A., Sabaretnam M. Selection of appropriate statistical methods for data analysis. *Ann. Card. Anaesth.* 2019;22(3):297-301. DOI: 10.4103/aca.ACA_248_18.
12. Ye C., Sweeny D., Sukbuntherng J. et al. Distribution, metabolism, and excretion of the anti-angiogenic compound SU5416. *Toxicol. In Vitro.* 2006;20(2):154-162. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.047.
13. Bykov V.V., Bykova A.V., Leonov K.A., Vengerovskii A.I., Udut V.V. Distribution and transmembrane transport as the basis of proper pharmacodynamics of an antithrombotic drug – an indolinone derivative. *Res. J. Pharm. Tech.* 2022;15(3):1241-1244. DOI: 10.52711/0974-360X.2022.00207.
14. Gibson C.R., Gleason A., Messina E. Measurement of total liver blood flow in intact anesthetized rats using ultrasound imaging. *Pharmacol. Res. Perspect.* 2021;9(2):e00731. DOI: 10.1002/prp2.731.
15. Fleck C., Bräunlich H. Factors determining the relationship between renal and hepatic excretion of xenobiotics. *Arzneimittelforschung,* 1990;40(8):942-946.
16. Bykov V.V., Smolyakova V.I., Chernysheva G.A. et al. Effect of a new antithrombotic drug GRS, a soluble guanylate cyclase stimulator, on endothelial dysfunction in rats after myocardial infarction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2021;172(12):707-710. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-12-707-710.
17. Asconapé J.J. Use of antiepileptic drugs in hepatic and renal disease. *Handb. Clin. Neurol.* 2014;119:417-432. DOI: 10.1016/B978-0-7020-4086-3.00027-8.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Быков Владимир Валерьевич – канд. мед. наук, ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; начальник отдела фармакологических исследований ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-5145-2184.

Быкова Арина Владимировна – канд. биол. наук, научный сотрудник ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-8495-8560.

Леонов Клим Андреевич – канд. хим. наук, руководитель группы хромато-масс-спектрометрии ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), Томск, Россия. ORCID: 0000-0003-4268-1724.

Венгеровский Александр Исаакович – д-р мед. наук, профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, заведующий кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России», Томск, Россия. ORCID: 0000-0001-5094-3742.

Удут Владимир Васильевич – д-р мед. наук, профессор, чл.-кор. РАН, заместитель директора по научной и лечебной работе, заведующий лабораторией физиологии, молекулярной и клинической фармакологии НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия. ORCID: 0000-0002-3829-7132.

ABOUT THE AUTHORS

Vladimir V. Bykov – Cand. Sci. (Med.), Assistant, Department of Pharmacology, Siberian State Medical University; Head, Department of Pharmacological Research, Innovative Pharmacological Research, LLC (IPHAR, LLC), Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-5145-2184.

Arina V. Bykova – Cand. Sci. (Bio.), Researcher, Innovative Pharmacological Research, LLC (IPHAR, LLC), Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-8495-8560.

Klim A. Leonov – Cand. Sci. (Chem.), Head, Chromatography-Mass Spectrometry Group, Innovative Pharmacological Research, LLC (IPHAR, LLC), Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0003-4268-1724.

Alexander I. Vengerovskii – Dr. Sci. (Med.), Professor, Honored Worker of Higher School of the Russian Federation, Head, Department of Pharmacology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0001-5094-3742.

Vladimir V. Udut – Dr. Sci. (Med.), Professor, Member of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Scientific and Therapeutic Work, Head, Laboratory of Physiology, Molecular and Clinical Pharmacology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia. ORCID: 0000-0002-3829-7132.