

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Есенина Анна Сергеевна

**Исследование фармакокинетики и фармакодинамики сукцината, входящего
в состав Мексидола, в опытах *in vitro* и *in vivo***

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Щулькин Алексей Владимирович

Рязань – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Янтарная кислота: биохимические и фармакологические эффекты	13
1.1.1. Основные биохимические реакции с участием янтарной кислоты	13
1.1.2. Рецептор янтарной кислоты (сукцинатный рецептор) – SUCNR1	15
1.1.3. Эндогенный уровень янтарной кислоты у человека и грызунов	19
1.1.4. Транспорт янтарной кислоты (сукцината) через билипидные мембраны клеток.....	20
1.1.5. Основные биохимические эффекты янтарной кислоты	24
1.2. Сукцинатсодержащие лекарственные препараты	29
1.2.1. Общая характеристика сукцинат-содержащих лекарственных препаратов.....	29
1.2.2. Фармакокинетика сукцината после приема сукцинат-содержащих лекарственных препаратов	34
1.3. Мексидол: фармакокинетика и фармакодинамика.....	37
1.3.1. Мексидол – основные фармакологические эффекты	37
1.3.2. Фармакокинетика этилметилгидроксипиридина, входящего в состав Мексидола	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1. Исследования <i>in vitro</i>	43
2.1.1. Клеточная линия.....	43
2.1.2. Культивирование клеток	43
2.1.3. Изучение абсорбции сукцината, входящего в состав Мексидола, <i>in vitro</i> на клетках линии Сасо-2.....	44
2.1.4. Оценка влияния сукцината, входящего в состав Мексидола, на SUCNR1 и его проникновения внутрь клеток линии НерG2.....	45
2.1.5. Определение концентрации инозитолмонофосфата в лизате клеток НерG2.....	45
2.1.6. Определение концентрации фексофенадина в транспортной среде.....	46

2.1.7. Определение концентрации метотрексата в транспортной среде	46
2.1.8. Определение внутриклеточной локализации SUCNR1 в клетках линии HepG2.....	47
2.2. Исследования <i>in vivo</i>	48
2.2.1. Экспериментальные животные	48
2.2.2. Исследование фармакокинетики сукцината после внутривенного введения Мексидола	50
2.2.3. Исследование фармакокинетики сукцината после внутрижелудочного введения Мексидола	50
2.2.4. Выделение цитоплазматической и митохондриальной фракций органов ..	51
2.3. Метод определения концентрации сукцината в биологических образцах	51
2.4. Статистический анализ	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55
3.1. Разработка и валидация методики количественного определения сукцината в плазме крови крыс	55
3.2. Частичная валидация методики количественного определения сукцината в гомогенате органов крыс, транспортной среде и лизате клеток HepG2.....	72
3.3. Проникновение сукцината, входящего в состав Мексидола, через монослой клеток линии Сасо-2.....	81
3.4. Проникновение сукцината, входящего в состав Мексидола, внутрь клеток HepG2.....	83
3.5. Фармакокинетика сукцината после внутривенного введения Мексидола крысам wistar в дозе 100 мг/кг массы.....	83
3.6. Фармакокинетика сукцината после внутрижелудочного введения Мексидола крысам wistar в дозе 100 мг/кг массы	87
3.7. Влияние сукцината, входящего в состав Мексидола, на активность сукцинатных рецепторов SUCNR1 в клетках линии HepG2	90
3.8. Влияние сукцината, входящего в состав Мексидола, на активность сукцинатных рецепторов SUCNR1 в сердце и почках крыс wistar.....	91
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	94

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ВЫВОДЫ	104
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	105
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сукцинат представляет собой промежуточный продукт цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), широко участвующий в обменных процессах организма. В митохондриях сукцинатдегидрогеназа окисляет сукцинат до фумарата и одновременно передаёт электроны убихинону дыхательной цепи. Таким образом, превращение сукцината связывает реакции ЦТК с клеточным дыханием и выработкой энергии. Помимо участия в дыхательной цепи митохондрий, этот метаболит выполняет сигнальные функции и служит субстратом для множества биосинтетических реакций, связывая углеводный, липидный и аминокислотный обмен. Именно плеiotропность его эффектов определяет неугасающий интерес исследователей к изучению роли сукцината в норме и при патологии [69, 88].

В 2004 году был обнаружен специфический рецептор для сукцината (GPR91, англ.: *G protein-coupled receptor 91* или SUCNR1, англ.: *succinate receptor 1*) [77]. Рецептор GPR91 связан с G-белком и не реагирует на другие промежуточные метаболиты цикла Кребса. Доказано, что SUCNR1 локализуется в почках, печени, селезенке, тонком кишечнике [77], в клетках-предшественниках CD34⁺ костного мозга человека, а также в эритроидных и мегакариоцитарных культурах и эритролейкемической клеточной линии TF-1 [151], ганглионарных клетках сетчатки [152], адипоцитах белой жировой ткани [34], тромбоцитах [135]. Механизм взаимодействия сукцината с SUCNR1 зависит от ткани, где располагается рецептор и приводит к увеличению уровня ионов кальция, инозитол-фосфата и ингибированию образования циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [33].

Активация SUCNR1 приводит к усилению клеточного дыхания и транспорта сукцината через клеточную мембрану, стабилизации белкового обмена, восстанавливает энергетический баланс, связанный, в первую очередь, с

гипоксией и гипергликемией, способствует увеличению васкуляризации сетчатки [152], агрегации тромбоцитов [135], стимуляции роста гемопоэтических клеток-предшественников, повышает уровни гемоглобина, тромбоцитов и нейтрофилов на фоне миелосупрессии, вызванной химиотерапией [151], повышает артериальное давление, стимулируя ренин-ангиотензиновую систему организма [77].

Физиологического уровня сукцината недостаточно для воздействия на SUCNR1, поэтому для активации рецептора необходимо повысить его концентрацию [68].

Препарат Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) – оригинальный отечественный лекарственный препарат, обладающий антигипоксической, антиоксидантной и мембраностабилизирующей активностью. Доказано, что этилметилгидроксипиридин в молекуле Мексидола оказывает антиоксидантное действие, а сукцинат отвечает за антигипоксические свойства. Фармакокинетика и фармакодинамика сукцината, входящего в состав Мексидола, на сегодняшний день практически не изучены, так же, как и не исследована его возможность влиять на SUCNR1.

Степень разработанности проблемы

Мексидол – оригинальный отечественный лекарственный препарат, молекула которого состоит из двух химически связанных и функционально значимых соединений: 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и янтарной кислоты [12]. Фармакокинетика (абсорбция, распределение, биотрансформация и выведение) этилметилгидроксипиридина подробно изучена в доклинических и клинических исследованиях [17, 20, 55]. В то же время фармакокинетика сукцината на данный момент практически не исследована. Описаны лишь единичные методы количественного определения сукцината в биологическом материале.

Также не изучена способность сукцината, входящего в состав Мексидола, стимулировать недавно открытый сукцинатный рецептор.

На кафедре фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России длительное время успешно ведутся работы по оценке фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных средств, в том числе и этилметилгидроксипиридина, входящего в состав препарата Мексидол.

Таким образом, исследование фармакокинетики и фармакодинамики сукцината, входящего в состав Мексидола, является логичным продолжением научного направления кафедры.

Цель исследования

Изучить фармакокинетику и фармакодинамику сукцината, входящего в состав Мексидола, в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Разработать и валидировать методику количественного определения сукцината в плазме крови, в гомогенатах тканей коры больших полушарий головного мозга, миокарда левого желудочка и печени крыс wistar, а также в лизатах клеток линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) и транспортной среде, с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).
2. *In vitro* изучить проницаемость сукцината через монослой клеточной линии аденокарциномы толстой кишки человека (Caco-2) и внутрь клеток линии HepG2 при добавлении Мексидола.
3. Изучить фармакокинетику сукцината после внутривенного введения Мексидола крысам-самцам wistar в дозе 100 мг/кг массы.
4. Исследовать фармакокинетику сукцината после внутрижелудочного

введения Мексидола крысам-самцам wistar в дозе 100 мг/кг массы.

5. *In vitro* на клетках линии HepG2 оценить влияние Мексидола на активность сукцинатных рецепторов SUCNR1.

6. *In vivo* на крысах-самцах wistar изучить активность сукцинатных рецепторов SUCNR1 в сердце и почках после внутрижелудочного и внутривенного введения Мексидола.

Научная новизна

В ходе выполнения исследования:

1. Разработана оригинальная методика количественного анализа сукцината в плазме крови и гомогенатах органов крыс wistar, а также в транспортной среде и в лизате клеток HepG2 с помощью ВЭЖХ-МС/МС;

2. Впервые в опытах *in vitro* изучено проникновение сукцината через монослой клеток линии Caco-2 и внутрь клеток линии HepG2 при добавлении Мексидола;

3. Впервые в опытах *in vivo* на крысах-самцах wistar изучена фармакокинетика сукцината после внутривенного и внутрижелудочного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг массы;

4. Впервые в опытах *in vitro* и *in vivo* доказана способность Мексидола активировать сукцинатные рецепторы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработана и валидирована методика ВЭЖХ-МС/МС анализа сукцината в плазме крови и гомогенатах органов крыс wistar, а также в транспортной среде и в лизате клеток HepG2. Она является чувствительной, селективной, точной, прецизионной и пригодна для количественного определения данного вещества в биологических образцах.

Изучена фармакокинетика и фармакодинамика сукцината, входящего в состав

Мексидола, в опытах *in vitro* и *in vivo*. В опытах *in vitro* было доказано, что при добавлении Мексидола сукцинат быстро проходит через монослой клеток линии Сасо-2, а при попадании внутрь клеток линии НерG2 быстро метаболизируется. Сукцинат, входящий в состав Мексидола, может активировать SUCNR1 в клетках линии НерG2.

В ходе исследования *in vivo* было установлено, что после однократного внутривенного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг массы сукцинат кратковременно проникает в цитоплазматическую и митохондриальную фракцию миокарда, коры больших полушарий головного мозга и печени и вызывает активацию SUCNR1 в сердце и почках. В то же время после внутрижелудочного введения Мексидола в аналогичной дозе содержание сукцината увеличивается только в плазме крови, а в органах практически не изменяется и не регистрируется активация SUCNR1.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено *in vitro* и *in vivo*.

В опытах *in vitro* на клетках линии Сасо-2 в специальных трансвелл-системах изучалось проникновение сукцината через клеточный монослой после добавления Мексидола. На клетках линии НерG2 оценивалась способность сукцината, входящего в состав Мексидола, активировать специфические сукцинатные рецепторы SUCNR1, а также его проникновение внутрь клеток.

В опытах *in vivo* на крысах-самцах wistar оценивалась фармакокинетика сукцината после однократного внутривенного и внутрижелудочного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг массы. Фармакокинетические параметры сукцината рассчитывались модельно-независимым методом. Помимо концентрации сукцината в плазме крови, анализировался его уровень в митохондриальной и цитоплазматической фракциях коры головного мозга, миокарда и печени крыс.

Концентрация сукцината в плазме крови и гомогенатах органов крыс wistar, а также в транспортной среде и лизате клеток линии НерG2 анализировалась с

помощью метода ВЭЖХ-МС/МС.

Полученные результаты обрабатывались адекватными статистическими критериями.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана, валидирована и апробирована методика количественного определения сукцината в плазме крови и гомогенатах органов крыс, а также в лизате клеток НерG2 и транспортной среде с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

2. Сукцинат, после применения Мексидола, хорошо проникает через билипидные мембраны. При однократном внутривенном введении Мексидола сукцинат достигает цитоплазматической и митохондриальной фракций миокарда, печени и коры больших полушарий головного мозга и быстро выводится из кровотока, а при однократном внутрижелудочном введении сукцинат быстро всасывается и элиминируется при минимальном изменении его уровня в исследованных клеточных фракциях.

3. Мексидол в опытах *in vitro* и *in vivo* активирует сукцинатные рецепторы SUCNR1.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Исследование соответствует пунктам 5 и 6 паспорта специальности «3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология»:

Пункт 5. Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток.

Пункт 6. Изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека.

Степень достоверности

Высокая степень доказательности результатов обусловлена достаточным объемом данных, полученных в экспериментах на клеточных линиях Caco-2 и HepG2, крысах wistar, с использованием адекватных и современных методов исследования (высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием, иммуноцитохимия) с последующей систематизацией и статистической обработкой полученных результатов с помощью специализированного программного обеспечения – Statsoft Statistica 13.0 (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и Microsoft Excel for MAC ver. 16.24 (ID 02984-001-000001).

Апробация результатов

Основные положения диссертации доложены, обсуждены и опубликованы в материалах: V Всероссийской научной конференции молодых ученых «Будущее Нейронаук» (Казань, 2022); VIII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2022); II Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященных 100-летию со дня рождения А.А. Никулина и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2023); Ежегодной научной конференции, посвященной десятилетию науки и технологий и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2023); XXVII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей (Санкт-Петербург, 2024); LXXXV научно-практической конференции с международным участием (Санкт-Петербург, 2024); I Пленуме фармакологов России, посвященному 160-летию со дня рождения академика Н.П. Кравкова «Традиции и перспективы развития российской фармакологии» (Рязань, 2025).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты работы используются при обучении студентов и клинических ординаторов на кафедре фармакологии, а также в научно-практической деятельности междисциплинарного научно-образовательного лабораторного центра ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнен обзор литературы, проведена большая часть экспериментальных работ *in vitro* и *in vivo*, хроматографические исследования, обработка и интерпретация результатов, подготовка публикаций по диссертационной работе. Личный вклад автора в выполнение диссертационной работы – более 80%.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликовано 9 работ, из которых 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 3 из них индексируются в цитатно-аналитической базе данных Scopus; 5 тезисов в материалах научных конференций; соавтор 1 научной монографии.

Структура и объем диссертации

Диссертация построена по классическому плану и состоит из введения, четырех глав, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Диссертация изложена на 130 страницах, иллюстрирована 19 рисунками и 19 таблицами. Список литературы включает 165 источников, из них 62 отечественных и 103 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Янтарная кислота: биохимические и фармакологические эффекты

1.1.1. Основные биохимические реакции с участием янтарной кислоты

Сукцинат (янтарная кислота) является важной эндогенной молекулой, играющей плеiotропную роль, выходящую за рамки метаболизма, как в физиологических, так и в патологических условиях.

Первоначально в период с 1911 по 1920 г. была установлена важная роль сукцината как переносчика водорода в аэробном дыхании [69].

В 1937 г. Г.А. Кребс описал ядро аэробного дыхания, цикл Кребса, также называемый циклом трикарбоновых кислот (ЦТК) или циклом лимонной кислоты [103]. Цикл является центральным метаболическим звеном, в котором энергия вырабатывается за счет окисления ацетил-КоА, получаемого из углеводов, жиров и белков, и является классическим описанием аэробного дыхания на сегодняшний день [102].

Согласно описанию цикла, образование сукцината в митохондриальном матриксе происходит в две последовательные стадии. Изначально α -кетоглутарат подвергается окислительному декарбоксилированию, трансформируясь в сукцинил-КоА под каталитическим действием α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса, с сопутствующим образованием восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и выделением CO_2 . Затем, сукцинил-КоА превращается в сукцинат при участии фермента сукцинил-КоА-синтетазы. Эта реакция представляет собой уникальный этап субстратного фосфорилирования в ЦТК, поскольку она сопряжена с синтезом гуанозинтрифосфата (ГТФ) с дальнейшим образованием аденозинтрифосфата (АТФ). Завершая данный сегмент цикла, сукцинат окисляется до фумарата под действием сукцинатдегидрогеназного комплекса [69].

После этого в течение длительного времени сукцинат рассматривался только как промежуточный продукт ЦТК, который считался его единственным путем синтеза [88].

Однако в дальнейшем было показано, что помимо образования сукцината из α -кетоглутарата его продукция осуществляется также через ряд других метаболических путей, таких как обратная активность сукцинатдегидрогеназы (SDH, *англ.: succinate dehydrogenase*), шунт γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и метаболизм глутамина [75].

В условиях гипоксии активность сукцинатдегидрогеназы (SDH) изменяется, что сопровождается сдвигом равновесия реакции в сторону обратного восстановления фумарата до сукцината. Например, в постишемическом периоде и в условиях гипоксии миокарда фумаровая кислота, образующаяся в результате метаболизма аспарагиновой кислоты и аденозинмонофосфата (АМФ), генерирует большое количество сукцината под действием SDH, что приводит к накоплению сукцината. После реперфузии накопленный сукцинат быстро окисляется SDH с образованием избытка активных форм кислорода (АФК) [99].

Макрофаги, подвергаясь провоспалительной M1-поляризации, активируют метаболический путь глутамина и повышают экспрессию глутаматдегидрогеназы. Последняя катализирует превращение глутамина в α -кетоглутарат, который служит субстратом для α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса при образовании сукцината [110].

В астроцитах ГАМК поступает в цитозоль, а затем с помощью глутамат/ГАМК-антипортера, локализованного во внутренней митохондриальной мембране, транспортируется в митохондрии, где под действием ГАМК-трансаминазы превращается в янтарный полуальдегид. Затем, сукциналидегид окисляется до сукцината под действием фермента сукциналидегиддегидрогеназы непосредственно в митохондриальном матриксе. [92]. Этот путь позволяет использовать ГАМК в качестве «топлива» для ЦТК.

Стимуляция липополисахаридом (ЛПС) макрофагов также приводит в них к увеличению уровня ГАМК и активности ГАМК-трансферазы (или ГАМК-

трансаминазы) [110].

Помимо ферментативного образования сукцината в ЦТК, он может быть получен и неферментативным способом в митохондриях при определенных условиях. Основным путем неферментативного образования янтарной кислоты является реакция между супероксидом и промежуточным продуктом ЦТК – α -кетоглутаратом с образованием сукцината и диоксида углерода (CO_2) [155]. В исследовании Н.И. Федотчевой и соавт. (2006) изучалось неферментативное образование сукцината в митохондриях печени крыс в условиях окислительного стресса. Авторами было доказано, что декарбоксилирование накопленного α -кетоглутарата окислителями (две оксокислоты с перекисью водорода и трет-бутилгидропероксидом) при инактивации α -кетоглутаратдегидрогеназы приводит к неферментативному образованию сукцината [85].

Таким образом, образование сукцината в клетке является метаболическим узлом, объединяющим несколько взаимосвязанных биохимических путей. Основной путь – цикл Кребса, где сукцинат является центральным интермедиатом. Однако в специфических условиях (гипоксия, специализированные ткани) его образование может идти через другие реакции, такие как ГАМК-шунт или восстановительное карбоксилирование и другие, что подчеркивает метаболическую пластичность клеток.

1.1.2. Рецептор янтарной кислоты (сукцинатный рецептор) – SUCNR1

SUCNR1 принадлежит к семейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCR, *англ.: G protein-coupled receptors*), которое представляет собой самую большую группу мембранных белков в геноме человека [98]. Эти белки состоят из семи трансмембранных областей с N-концом, локализованным внеклеточно, и C-концом внутриклеточно.

GPCR делятся на различные подсемейства в соответствии с гомологией последовательностей и различными лигандами. GPCR обеспечивают связывание агонистов со специфическими G-белками, что в свою очередь приводит к

модуляции нижестоящих эффекторных белков [128]. В качестве лигандов, активирующих данные трансмембранные рецепторы, могут выступать гормоны, нейротрансмиттеры, фотоны, ионы и другие вещества, которые могут варьировать в размерах от небольших молекул и пептидов до белков [26, 53].

В 2001 году на хромосоме 3q24-3q25 был идентифицирован кластер из шести рецепторов, связанных с G-белком, включая четыре орфанных рецептора: GPR86, GPR87, H963 и GPR91 [165]. GPR91 имел высокую гомологию последовательностей с семейством пуринорецепторов P2Y, поэтому предполагалось, что GPR91 активируется пуринергическими соединениями [68]. Данное предположение оказалось ошибочным, и в 2004 году He W. et al. (2004) доказали, что GPR91 специфически активируется сукцинатом [77], а ген, кодирующий GPR91, был переименован в сукцинатный рецептор 1 (*SUCNR1*) [68].

Было однозначно показано, что сукцинат является эндогенным лигандом для GPR91, путем тестирования 800 фармакологически активных соединений и известных лигандов семейства GPCR, а также 200 карбоновых кислот и соединений, структурно родственных сукцинату, включая интермедиаты цикла лимонной кислоты (α -кетоглутарат, цитрат, изоцитрат, малат и оксалоацетат), а также множество пуринергических соединений. Только малат и метилмалонат были способны активировать *SUCNR1*, хотя и в 5–10 раз слабее, чем сукцинат [77].

Была создана частичная трехмерная модель GPR91. Установлено, что мутации Arg99, His103, Arg252 и Arg281 препятствуют активации рецептора, в то время как мутации His249, Arg255, Tyr107 не влияют на функцию рецептора. Для активации GPR91 необходимы одновременно 4 остатка Arg99, His103, Arg252 и Arg281, что обеспечивает дополнительные уникальные условия для связывания рецептора с сукцинатом [77]. По литературным данным, сукцинатный рецептор человека кодирует белок, состоящий из 334 аминокислот. Однако в положении 5 этой последовательности расположен остаток метионина. Анализ Kozak-последовательности в данной области указывает на то, что именно этот второй

метионин служит фактическим сайтом инициации трансляции, что приводит к образованию рецептора длиной 330 аминокислот [165]. Последовательность SUCNR1 имеет высокую степень гомологии у человека, крысы и мыши, за исключением С-конца, который на 12 аминокислот короче у грызунов [68] (Рисунок 1).

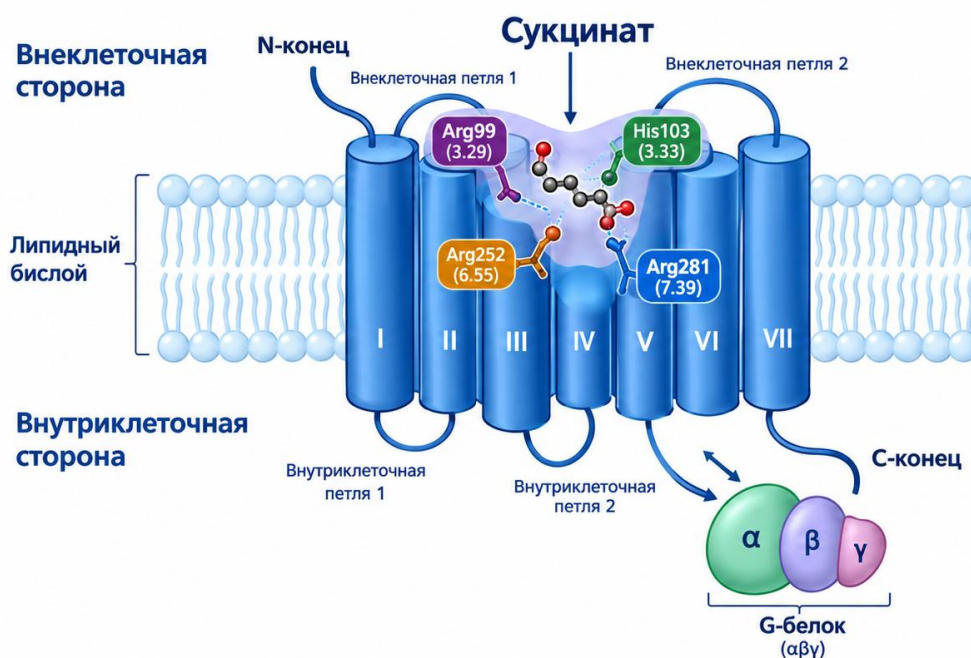


Рисунок 1 – Структура сукцинатного рецептора SUCNR1 (на основе данных [68])

Активация GPCR вызывает конформационную перестройку рецептора, что способствует взаимодействию с гетеротримерным G-белком и активирует их диссоциацию на α -субъединицу и $\beta\gamma$ -димер. Эти субъединицы способны модулировать активность эффекторов и опосредовать клеточные реакции. Существует четыре основных семейства G-белков, которые различаются сигнальными путями, к которым они подключаются: Gi/o и Gs регулируют цАМФ посредством модуляции аденилатциклазы, Gq/11 индуцирует высвобождение $[Ca^{2+}]$ из внутриклеточных запасов и G12/13 участвует в миграции, росте и делении клеток [164].

Первоначально было описано, что SUCNR1 связан как с белками Gi, так и с Gq в клетках эмбриональной почки человека (HEK293, *англ.: human embryonic*

kidney 293). Несколько авторов неоднократно подтверждали активацию G_i , демонстрируя снижение уровня цАМФ при связывании сукцината с SUCNR1 как в гетерологичных, так и в нативных системах [98, 140].

Показано, что в HEK293 и в клетках почек собаки Мадина-Дарби (MDCK, *англ.: Madin–Darby canine kidney cells*) сукцинат индуцирует внутриклеточное высвобождение кальция, образование инозитолтрифосфата, активацию внеклеточно-сигнально-регулируемых киназ 1/2 (ERK1/2, *англ.: extracellular signal-regulated kinase*) и снижение концентрации цАМФ, которые являются сигнальными путями, активирующимися под действием G_q или G_i , что зависит от концентрации сукцината [77].

В гемопоэтических клетках-предшественниках CD34+ костного мозга человека, а также в культурах эритроидов и мегакариоцитов и эритролейкемической клеточной линии TF-1 передача сигналов опосредована G_i белком и приводит к пролиферации данных клеточных линий из-за активации ERK1/2 и накопления инозитолфосфата [151].

В тромбоцитах внутриклеточная передача сигналов SUCNR1 приводит к снижению уровня цАМФ, фосфорилированию протеинкиназы В (Akt, *англ.: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*), опосредованному активацией фосфоинозитид-3-киназы- β , и десенсибилизации рецепторов. При этом не происходит высвобождения цитозольного кальция [135].

В кардиомиоцитах сукцинат стимулирует SUCNR1, связанный с G_q белком, что приводит к увеличению внутриклеточного Ca^{2+} и цАМФ, а также к активации митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK, *англ.: mitogen-activated protein kinases*) и ERK1/2 [132,136].

Также было обнаружено, что SUCNR1 высоко экспрессируется в незрелых дендритных клетках (ДК), полученных из моноцитов. Сукцинат оказывает прямое влияние на иммунную функцию этих клеток. Он связывается с SUCNR1 на незрелых моноцитарных ДК и индуцирует внутриклеточную мобилизацию кальция и фосфорилирование ERK1/2, способствуя созреванию незрелых моноцитарных ДК [157] и выработке провоспалительных цитокинов [141].

Однако точка зрения о связи SUCNR1 с Gq была оспорена некоторыми авторами и было высказано предположение, что наблюдаемая мобилизация $[Ca^{2+}]$ является следствием активации фосфолипазы C (PLC- β , *англ.: phospholipase C*) $\beta\gamma$ -димером [98, 140].

Таким образом, благодаря влиянию на рецептор янтарной кислоты (сукцинатный рецептор) – SUCNR1, сукцинат регулирует многочисленные процессы в организме, а не только выполняет энергетическую функцию, являясь субстратом цикла Кребса.

1.1.3. Эндогенный уровень янтарной кислоты у человека и грызунов

Концентрация эндогенного сукцината варьирует в зависимости от типа ткани, особенностей метаболизма и наличия патологий. Кроме того, на этот показатель влияют демографические характеристики (возраст и пол), состояние здоровья исследуемого организма, а также технические аспекты – условия эксперимента, метод определения и пробоподготовка образцов.

Например, концентрации сукцината в плазме, измеренные с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией у грызунов, варьируют от 6 до 20 мкМ, тогда как у человека уровни сукцината были обнаружены от 2 до 3 мкМ в сыворотке [76] и от 2 до 20 мкМ в плазме крови [66]. Исследование Sharma et al. (2013) показало, что средняя концентрация сукцината в плазме крови здоровых взрослых добровольцев составляет $2,2 \pm 1,6$ мкмоль/л [109]. Концентрация сукцината в моче мышей находится в диапазоне 20-30 мкМ в физиологических условиях [139]. Нормальный уровень содержания сукцината в моче у здоровых людей составляет 375-5975 нмоль/ммоль креатинина [149].

Хэ и соавт. (2004) определили, что полумаксимальная эффективная концентрация для сукцинат-индуцированной активации SUCNR1 человека и мыши составляла 56 ± 8 и 28 ± 5 мкМ соответственно, что указывает на то, что при нормальных физиологических условиях уровни сукцината в плазме слишком низки для активации рецепторов, поэтому небольшое повышение концентрации

сукцината в крови не может полностью активировать GPR91 [77]. Быстрое повышение уровня сукцината до миллимолярного диапазона (1000–2690 мкМ) было продемонстрировано при патологических состояниях, например у пациентов с ишемической болезнью сердца и после трансплантации печени [132]. Это может свидетельствовать о том, что GPR91 в значительной степени функционирует как метаболический датчик окислительного повреждения, а не как физиологический медиатор передачи сигналов [68].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что эффекты сукцината зависят от его концентрации – высокие концентрации оказывают рецепторное действие, а низкие – поддерживают метаболические процессы.

1.1.4. Транспорт янтарной кислоты (сукцината) через билипидные мембраны клеток

Из-за своей анионной природы и гидрофильных характеристик сукцинат не может пассивно диффундировать через билипидные мембраны клеток [91], что требует участия специализированных транспортных систем для облегчения его транслокации. Появляющиеся данные свидетельствуют о том, что специфические транспортеры могут облегчать перемещение сукцината через клеточные мембраны. Хотя точный механизм, регулирующий высвобождение и поглощение сукцината из клеток, еще не полностью изучен, текущие исследования показывают, что он находится под строгим контролем [86]. Интересно, что транспортеры сукцината демонстрируют субстратную гибкость и могут участвовать в трансмембранном переносе и других молекул.

Семейство переносчиков растворенных веществ (SLC, *англ.: solute carrier*) включает большой класс трансмембранных транспортеров.

SLC25A10 – это митохондриальный переносчик дикарбоксилата, расположенный на внутренней митохондриальной мембране [88]. В основном он транспортирует дикарбоновые кислоты, такие как сукцинат и фумарат, а также

малат (яблочную кислоту), из митохондрий в цитоплазму в обмен на неорганический фосфат, обеспечивая субстраты для глюконеогенеза и синтеза мочевины, а также поддерживая распределение и гомеостаз промежуточных продуктов ЦТК между митохондриями и цитозолем [117,150].

SLC25A10 транспортирует сукцинат из митохондриального матрикса в межмембранное пространство, что является первым этапом транспорта сукцината во внеклеточное пространство [75].

Далее сукцинат через потенциалзависимый анионный канал (VDAC/porin, *англ.: voltage-dependent anion channel*) выходит из межмембранного пространства в цитозоль. Показано, что проницаемость цитрата, сукцината и фосфата при нулевом напряжении снижается до 5-11% от потока в открытом состоянии канала в зависимости от изучаемого аниона [94].

Высвобождение сукцината во внеклеточную среду может происходить через транспортеры органических анионов/дикарбоксилатов (ОАТ, *англ.: organic anion transporters*) [67] и транспортеры монокарбоксилатов (МСТ, *англ.: monocarboxylate transporters*) [120].

ОАТ, являющиеся членами семейства SLC22, играют жизненно важную роль в транспортировке малых метаболитов, лекарств и токсинов, особенно в печени и почках [113]. Они функционируют как обменники для входящего транспорта органических анионов в обмен на выведение продуктов метаболизма в кровотоки. Было идентифицировано и охарактеризовано множество подтипов ОАТ с различной субстратной специфичностью, локализацией в тканях и регуляцией. В частности, ОАТ1-ОАТ3, ОАТ5 и ОАТ10 могут обменивать органические анионы с сукцинатом в качестве противоиона [114,160].

Основными базолатеральными транспортерами, опосредующими выведение сукцината из эпителия проксимальных канальцев почек, являются ОАТ 1 и 3 [96,106]. Транспортер ОАТ10 опосредует выведение сукцината через апикальную мембрану и, как было показано, экспрессируется в почках и толстой кишке [161].

МСТ относятся к семейству SLC16 и играют ключевую роль в транспортировке короткоцепочечных монокарбоксилатов, питательных веществ,

гормонов и аминокислот протонно-связанным образом [120].

МСТ1 – член семейства SLC16, у человека кодируется геном *SLC16A1*, и представляет собой белок, который транспортирует монокарбоновые кислоты, такие как молочная кислота и пируват, в клетки. Недавние исследования показали, что МСТ1 может переносить сукцинат во внеклеточное пространство через плазматическую мембрану миокарда, скелетных мышц и сетчатки [90,107,112].

Так, в работе Редди А. и соавт. (2020), проведенной на мышах и людях было показано селективное и локальное высвобождение сукцината, как быстрая реакция на выполнение физических нагрузок. При резком увеличении потребности в энергии и невозможности поддержания энергоснабжения активируется анаэробный гликолиз, что приводит к избыточному образованию молочной кислоты и закислению клетки. Снижение значения pH приводит к протонированию сукцината и его превращению из дикарбоксилата в монокарбоксилат, который является субстратом для переносчика плазматической мембраны МСТ1, и обеспечивает pH-управляемое высвобождение [120].

Помимо сукцината, вырабатываемого самими клетками, еще одним важным источником внутриклеточного сукцината является его поступление извне. В этом процессе также принимают участие специфические белки-переносчики.

Внеклеточный сукцинат может абсорбироваться с участием натрий-зависимых транспортеров дикарбоновых кислот, которые опосредуют Na⁺-связанный транспорт различных дикарбоксилатных анионов, в том числе сукцината. К ним относят изоформы SLC13A2 (NADC1), SLC13A3 (NaDC3), SLC13A5 (NaCT). Они имеют различное тканевое распространение и субстратную специфичность [71,115,130].

В клетках толстой кишки Caco-2 было показано, что приток сукцината опосредуется главным образом SLC13A2, который обладает высокой селективностью к сукцинату, а также SLC13A5, который более селективен к цитрату, чем к сукцинату [163]

SLC13A2 преимущественно экспрессируется в почках и кишечнике [116]. В

почках он реабсорбирует промежуточные продукты ЦТК из канальцевого фильтрата, тогда как в кишечнике он поглощает переваренные питательные вещества [144]. Более того, SLC13A3 имеет более широкое тканевое распределение и более высокое сродство к субстрату, чем SLC13A2 [93].

Интересно, что поглощение сукцината SLC13A2 и SLC13A3 ингибируется активацией SUCNR1 в почечных клетках [144], что указывает на взаимосвязь между регуляцией его внутриклеточных/внеклеточных концентраций и функционированием SUCNR1 для поддержания гомеостаза.

Также, сукцинат может транспортироваться Na^+ /цитратным котранспортером, который преимущественно локализуется в печени и головном мозге, хотя и с меньшей аффинностью [116, 131].

Обобщенная схема транспорта сукцината и механизм его действия представлены на Рисунке 2.

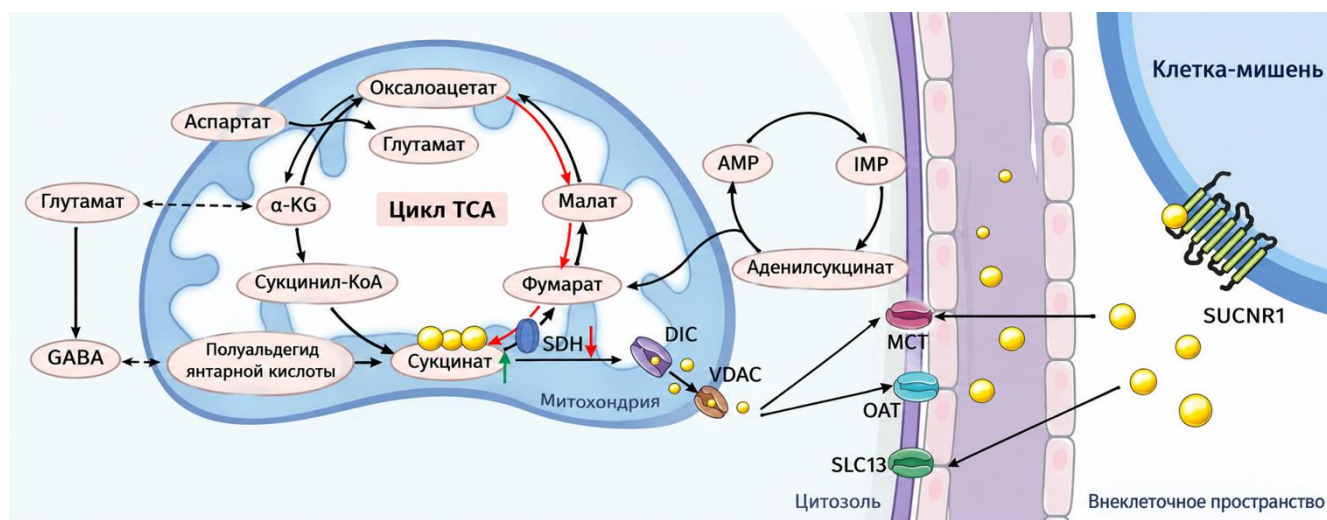


Рисунок 2 – Транспорт сукцината и механизм его действия (Цит. по: Huang H., 2024) [75]

Таким образом, сукцинат имеет сложную транспортную систему, которая обеспечивает его селективное распределение как внутри компартментов клетки (митохондрии), так и в клетках и тканях разных типов, что, в свою очередь, определяет специфичность биохимических и фармакологических эффектов, оказываемых данной молекулой.

1.1.5. Основные биохимические эффекты янтарной кислоты

Доказано, что SUCNR1 локализуется в почках, печени, селезенке, тонком кишечнике [77], в клетках-предшественниках CD34⁺ костного мозга человека, а также в эритроидных и мегакариоцитарных культурах и эритролейкемической клеточной линии TF-1 [151], в сетчатке [152], адипоцитах белой жировой ткани [33], тромбоцитах [135].

В сетчатке GPR91 экспрессируется в телах ганглиозных клеток и в меньшей степени в клетках наружного и внутреннего ядерного слоя и в пигментном эпителии [152].

При гипоксии сетчатки происходит увеличение внеклеточной концентрации сукцината, который активирует рецепторы GPR91, что приводит к увеличению ее васкуляризации и как следствие к восстановлению адекватного кровотока [126].

Sapieha et al. (2008) продемонстрировали, что GPR91 стимулирует ангиогенез, контролируя экспрессию ряда ангиогенных факторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, *англ.: vascular endothelial growth factor*), ангиопоэтин-1 (Ang-1, *англ.: angiopoietin-1*) и ангиопоэтин-2 (Ang-2, *англ.: angiopoietin-2*), и подавляет антиангиогенный тромбоспондин-1 [152].

На модели кислородно-индуцированной ретинопатии у крыс было показано, что в условиях гипоксии сигнальный путь GPR91-ERK1/2-C/EBP β (с-Fos, HIF-1 α (*англ.: Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*)) играет ключевую роль в регуляции транскрипции VEGF в ганглиозных клетках сетчатки [154].

В сердце доказано, что внеклеточный сукцинат функционирует как сигнальная молекула, опосредующая деление митохондрий посредством паракринных и аутокринных путей, связанных с рецептором GPR91. Внеклеточная стимуляция GPR91 сукцинатом активирует митохондриальное деление через два основных сигнальных каскада: протеинкиназу C (PKC, *англ.: protein kinase C*) и внеклеточные сигнал-регулируемые киназы. В первом случае, активация GPR91, опосредованная сукцинатом, усиливает фосфорилирование ERK1/2. Фосфорилированные ERK1/2 затем транслоцируются в митохондрии, где

они фосфорилируют митохондриальный фактор деления (MFF, *англ.: mitochondrial fission factor*), что облегчает транслокацию динамин-родственного белка 1 (Drp1, *англ.: dynamin-related protein 1*) к митохондриям и, как следствие, способствует их делению. Альтернативно, стимуляция Gq-сопряженного рецептора GPR91 может инициировать сигнальные каскады с участием РКС и митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК, *англ.: mitogen-activated protein kinases*). В частности, РКС δ связывается с цитоплазматическим Drp1, индуцируя его фосфорилирование. Последующая транслокация комплекса РКС δ -фосфорилированный Drp1 в митохондрии приводит к индукции митохондриального деления [136].

GPR91 экспрессируется также в CD34⁺ клетках-предшественниках костного мозга человека, а также в эритроидных и мегакариоцитарных клеточных культурах и эритролейкемической клеточной линии TF-1. Данный рецептор опосредует сукцинат-индуцированные пролиферативные ответы посредством активации сигнального пути Gi/ERK1/2. Более того, было показано, что *in vivo* введение сукцината в мышинной модели химиотерапевтически-индуцированной миелосупрессии приводит к повышению уровней гемоглобина, тромбоцитов и нейтрофилов [151]. Таким образом, введение сукцината может быть полезным для пациентов, после химиотерапии.

Рецептор SUCNR1 экспрессируется в тромбоцитах человека. Сукцинат был идентифицирован как агонист агрегации тромбоцитов, способный независимо активировать тромбоциты и дозозависимо индуцировать их агрегацию. Этот процесс сопровождается активацией гликопротеина GPIIb-IIIa (маркера активации тромбоцитов) и экспрессией Р-селектина (маркера дегрануляции). Стимуляция тромбоцитов сукцинатом приводила к снижению уровня цАМФ и активации фосфопротеина, стимулируемого вазодилататором (VASP, *англ.: vasodilator-stimulated phosphoprotein*), однако не вызывала высвобождения цитозольного кальция. Более того, было установлено, что внутриклеточная передача сигнала SUCNR1 приводит к фосфорилированию протеинкиназы В (Akt, *англ.: protein kinase B*), опосредованному активацией фосфоинозитид 3-киназы- β ,

и десенсibilизации рецептора. Кроме того, было показано, что агрегация тромбоцитов также зависит от активности тирозин-протеинкиназы c-Src (Src, *англ.: sarcoma*), образования тромбоксана A₂ и высвобождения аденозинтрифосфата (АТФ)/аденозиндифосфата (АДФ) [135].

SUCNR1 высоко экспрессируется в адипоцитах белой жировой ткани [145]. В условиях гипогликемии, гормоны, такие как глюкагон, индуцируют липолиз в адипоцитах бурой жировой ткани, что приводит к катаболизму триглицеридов с высвобождением свободных жирных кислот для энергетического обеспечения. Этот липолитический процесс опосредуется активирующими Gs-белками. В SUCNR1-экспрессирующих адипоцитах сукцинат подавляет активность аденилатциклазы, снижает продукцию цАМФ и как следствие ингибирует липолиз. Это, в свою очередь, может ограничивать высвобождение свободных жирных кислот из адипоцитов, препятствуя их доступности для системного энергетического метаболизма [125]. Повышение концентрации сукцината в плазме крови у лиц с ожирением, метаболическим синдромом и сахарным диабетом 2 типа, может свидетельствовать о том, что высокие уровни сукцината могут ингибировать липолиз в условиях метаболического избытка, характеризующегося высоким содержанием таких энергетических субстратов, как глюкоза и свободные жирные кислоты [77, 78, 123].

В исследовании на мышинной модели диет-индуцированного ожирения оценивались эффекты длительного перорального введения сукцината. Полученные данные свидетельствуют о том, что включение сукцината в рацион способствует эффективному снижению массы подкожной жировой клетчатки и уровня триглицеридов в печени. Уменьшение объема жировой ткани при этом было обусловлено активацией липолиза и ингибированием липогенеза, что привело к уменьшению размера адипоцитов в подкожных депо. Эти метаболические изменения, вероятно, лежат в основе наблюдаемого улучшения толерантности к глюкозе [134].

В печени сукцинатный рецептор экспрессируется в покоящихся звездчатых клетках, и его экспрессия снижается по мере роста активации клеток [137].

Так Ли и соавт. (2015) продемонстрировали, что в присутствии сукцината в звездчатых клетках печени наблюдается повышенная экспрессия GPR91 с последующим увеличением скорости дифференцировки клеток в 2 раза, что приводит к их активации. Также в исследовании на моделях *in vitro* и *in vivo* было показано, что звездчатые клетки, культивируемые и обработанные сукцинатом или ингибиторами SDH (малонат, пальмитат/холин и метионин-холин дефицитные среды), вызывают не только увеличение экспрессии GPR91, но и альфа-гладкомышечного актина (α -SMA, *англ.: alpha smooth muscle actin*), трансформирующего фактора роста бета (TGF- β , *англ.: transforming growth factor-beta*) и коллагена I типа, маркеров фиброгенного ответа. С другой стороны, трансфекция этих клеток мРНК для GPR91 аннулировала продукцию α -SMA, индуцированную сукцинатом, что указывает на специфичность профиброгенных ответов на передачу сигналов GPR91 [133].

В 2004 году Хэ Вэйхай и соавт. в работе «Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors» впервые установили локализацию GPR91 (SUCNR1) в проксимальных канальцах почек, а также, в меньшей степени, в дистальных канальцах и клетках юкстагломерулярного аппарата (JGA, *англ.: juxtaglomerular apparatus*) [77].

В последующих работах было уточнено, что SUCNR1 локализуется на люминальной поверхности почечных сосудов, в частности афферентной артериолы и клубочковой сосудистой сети. Помимо этого, GPR91 экспрессируется на апикальной мембране ряда сегментов почечных канальцев – в кортикальной толстой восходящей части петли Генле, включая апикальную мембрану макулы денсы, а также в корковом и медуллярном собирательном протоке [63, 104, 139]. Было показано, что сукцинат опосредует высвобождение ренина из JGA через SUCNR1, расположенный на мембране эндотелия, обращенной в просвет [139], и на апикальной мембране клеток макулы денсы [63,104]. Изучение микроперфузии в сочетании с визуализацией изолированных клубочков в реальном времени показали, что перфузия сукцинатсодержащим буфером индуцировала высвобождение ренина из зернистых клеток JGA и

вызывала быструю вазодилатацию афферентной артериолы. В совокупности это говорит о том, что SUCNR1 играет ключевую роль в развитии клубочковой гиперfiltrации и активации ренин-ангиотензиновой системы почек.

Рубич Т. и соавт. (2008) в своей работе показали, что дендритные клетки (ДК) человека и мыши, а также макрофаги экспрессируют GPR91 и используют этот рецепторный путь для усиления своего иммуностимулирующего потенциала. При этом в Т- и В-клетках, и особенно в CD14⁺ моноцитах, экспрессия рецептора была низкой или не обнаруживалась. Эти данные позволили предположить, что GPR91 индуцируется при дифференцировке моноцитов в незрелые моноцитарные ДК. В незрелых ДК сукцинат дозозависимо стимулирует миграцию клеток и таким образом опосредует хемотаксис. Кроме того, SUCNR1 и Toll-подобные рецепторы действуют синергично, потенцируя выработку воспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли α (TNF α , англ.: tumor necrosis factor- α) и интерлейкина-1 β [157].

Кроме того, сукцинат способен передавать сигналы через GPR91 (SUCNR1) на ДК и усиливать антиген-специфическую активацию Т-клеток, а также может стабилизировать и активировать HIF-1 α в макрофагах [97]. При этом было обнаружено, что недостаток HIF-1 α в ДК кишечника усугубляет колит [138] через нарушение индукции защитных регуляторных Т-клеток [95].

Таким образом, молекула сукцината оказывает широкий спектр эффектов в живом организме, поэтому янтарная кислота может использоваться как фармакологический агент, а SUCNR1, как перспективная фармакологическая мишень.

1.2. Сукцинатсодержащие лекарственные препараты

1.2.1. Общая характеристика сукцинат-содержащих лекарственных препаратов

Сукцинатсодержащие лекарственные препараты активно используются в различных отраслях медицины [38]. При этом все сукцинатсодержащие препараты можно разделить на две группы.

Первая группа – препараты, в которых сукцинат используется как фармакологический агент. В России широкое распространение данные препараты получили как антиоксиданты и цитопротекторы. К ним относятся Мексидол, Цитофлавин, Реамберин, Ремаксол, Лимонтар.

Вторая группа – лекарственные препараты разных фармакологических групп (противомигренозные средства, холинолитики, антидепрессанты и т.д.) [24], в которых сукцинат используется для получения солей с целью модификации фармакокинетических свойств основной действующей молекулы.

Цитофлавин в своем составе содержит янтарную кислоту, инозин, никотинамид и рибофлавин. Сукцинат, окисляясь ферментом SDH (комплекс II) в митохондриях, обеспечивает сопряжение ЦТК с дыхательной цепью, что приводит к передаче электронов, формированию протонного градиента и, как следствие, повышению синтеза АТФ – тем самым улучшая клеточное энергетическое обеспечение и тканевое дыхание [36]. Поэтому Цитофлавин активно используется для лечения последствий инфаркта мозга, цереброваскулярных болезней (хроническая ишемия мозга, церебральный атеросклероз, гипертензивная энцефалопатия) [27, 64], неврастении, диабетической полинейропатии [46], черепно-мозговой травмы [19], для профилактики когнитивных расстройств после обширных хирургических вмешательств у пациентов старше 60 лет [3, 51, 52].

Реамберин – меглюмина натрия сукцинат, проявляет антигипоксическое

и антиоксидантное действие за счёт усиления аэробного метаболизма в клетке: снижает образование свободных радикалов, восстанавливает внутриклеточные энергетические ресурсы. Препарат стимулирует ферментативную активность цикла Кребса, улучшает усвоение клетками глюкозы и жирных кислот, способствует нормализации кислотно-щелочного равновесия и газового состава крови [61]. Дополнительно оказывает лёгкое мочегонное действие [2,40]. Кроме этого, сукцинат, входящий в состав препарата Реамберин, усиливает процессы сукцинилирования биомолекул и оказывает объёмное действие за счёт взаимодействия с белковыми компонентами плазмы крови, способствуя поддержанию её онкотического давления [34].

Препарат Реамберин показан к применению у взрослых и детей с 1 года в качестве средства, корригирующего гипоксию [1] и способствующего выведению токсических веществ при острых интоксикациях различного происхождения, например в комплексной терапии больных острым вирусным гепатитом (А, В, С, микст) [45], острым панкреатитом [38], для коррекции когнитивных нарушений на фоне черепно-мозговой травмы [35].

Препарат Ремаксол включает в свой состав инозин, меглюмин, метионин, никотинамид и янтарную кислоту. Сукцинат – один из ключевых действующих компонентов – представляет собой универсальный промежуточный метаболит, играющий центральную роль в энергетическом обмене. В условиях повышенной нагрузки на энергетические системы организма – например, при оксидативном стрессе или гипоксии – основным источником энергии становится окисление янтарной кислоты. Таким образом, она предоставляет клетке дополнительный «вдох», усиливая её адаптационные возможности и способствуя выживанию в условиях патологических изменений [43]. Данный препарат используется при синдроме внутripечёночного холестаза, при хронических диффузных заболеваниях печени (алкогольная болезнь печени, токсическое поражение печени, фиброз и склероз печени, жировая дегенерация печени, хронический гепатит) [18, 29,60], а также при нарушениях функции печени вследствие острого или хронического её повреждения (токсические,

алкогольные, вирусные, лекарственные гепатиты) [18, 41, 43, 47].

Метаболический препарат Лимонтар, содержащий в своем составе лимонную и янтарную кислоты [44], также как и непосредственно янтарная кислота используются при алкогольной интоксикации [5], при экстремальных физических, психоэмоциональных, спортивных нагрузках, при астенических, астенопатических, апатоабулических расстройствах, а также при анорексии [44], может улучшать течение беременности, рост и развитие плода [31].

Препарат Лимонтар выступает в качестве регулятора тканевого метаболизма, стимулируя окислительно-восстановительные реакции и интенсифицируя ресинтез АТФ. Данные биохимические эффекты детерминируют его выраженные антигипоксические и антиоксидантные свойства [31].

Механизм детоксикационного влияния янтарной кислоты направлен на нивелирование негативных эффектов и снижение концентрации ацетальдегида. Метаболизм этанола индуцирует дисбаланс окислительно-восстановительного гомеостаза, что ограничивает способность клеток к окислению ряда субстратов, включая изолимонную, яблочную и глутаминовую кислоты, а также самого ацетальдегида. В этих условиях энергопродукция и ресинтез АТФ осуществляются преимущественно через сукцинатоксидазный путь. Применение препарата повышает уровень и последующую утилизацию сукцината, что активирует метаболические каскады, ответственные за детоксикацию ацетальдегида посредством его конверсии в ацетат [44].

Суматриптана сукцинат относится к классу триптанов и представляет собой соль, образованную взаимодействием суматриптана с одним эквивалентом янтарной кислоты. Препарат проявляет высокую селективность в отношении серотониновых рецепторов подтипа 5-НТ₁. Активация 5-НТ₁-рецепторов, локализованных на гладкомышечных клетках сосудистой стенки, индуцирует вазоконстрикцию менингеальных, дуральных, церебральных и пиальных сосудов, что лежит в основе купирования клинических проявлений мигрени [50]. Кроме этого, стоит отметить, что превращение неионогенной

формы суматриптана в частично ионизированную аморфную протонированную сукцинатную соль сопровождается существенным увеличением его кажущейся растворимости [65]. Суматриптана сукцинат применяется для купирования приступов мигрени с аурой или без нее, а также кластерных головных болей [72].

Метопролол – селективный β_1 -адреноблокатор, оказывающий отрицательное инотропное, хронотропное, дромотропное и батмотропное действие на сердце. Кроме того, он подавляет секрецию ренина и, как следствие, снижает образование ангиотензина II за счёт блокады β_1 -адренорецепторов в юкстагломерулярных клетках почек [15]. Метопролола сукцинат реализован в виде многоэлементной лекарственной системы, состоящей из множества гранул с модифицированным высвобождением активного вещества. Формирование сукцинатной соли не только улучшает растворимость липофильного метопролола, но и существенно модифицирует его фармакокинетические параметры [23]. Такой подход обеспечивает пролонгированное поступление действующего вещества в системный кровоток, что способствует поддержанию стабильной терапевтической концентрации метопролола, минимизирует колебания плазменных уровней и, соответственно, снижает риск развития нежелательных эффектов. В результате повышаются как эффективность, так и безопасность терапии. Дополнительным преимуществом является улучшение комплаентности пациентов вследствие снижения кратности приёма препарата до одного раза в сутки по сравнению с немодифицированными формами [37].

Метопролола сукцинат применяется в клинической практике для лечения широкого спектра сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний. Препарат показан при артериальной гипертензии, стенокардии напряжения, а также в составе комбинированной терапии при стабильной хронической сердечной недостаточности с систолической дисфункцией левого желудочка. В постинфарктном периоде метопролол снижает риск летального исхода и частоту повторных инфарктов миокарда. Кроме того, он эффективен при

различных нарушениях сердечного ритма – включая наджелудочковую тахикардию, желудочковые экстрасистолы и контроль частоты желудочковых сокращений при фибрилляции предсердий. Препарат также используется при функциональных кардиальных расстройствах, сопровождающихся тахикардией, и в качестве средства профилактики приступов мигрени [4, 15].

Десвенлафаксина сукцинат относится к классу ингибиторов обратного захвата серотонина и норадреналина (ИОЗСН). Структурно он является активным метаболитом венлафаксина – О-десметилвенлафаксином, коммерциализуемым в виде моногидрата сукцинатной соли [119]. Препарат был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA, *англ.: Food and Drug Administration*) в 2008 году для терапии большого депрессивного расстройства [79]. На территории Российской Федерации десвенлафаксина сукцинат не зарегистрирован.

Темозоломид (TMZ, *англ.: Temozolomide*) – пролекарство для лечения глиобластомы, одобренное FDA в 1999 году. Ограниченное его применение было связано с быстрой деградацией до неактивного продукта 5-аминоимидазол-4-карбоксамид. Проблема химической нестабильности была решена созданием сокристалла темозоломида с янтарной кислотой (TMZ-SA), что позволило обеспечить его стабильность в течение более 6 месяцев, предотвращая как деградацию активного вещества, так и нежелательные изменения цвета [121].

Таким образом, сукцинат входит в состав широкого спектра лекарственных препаратов и является не только универсальным промежуточным метаболитом цикла Кребса, но и удобным фармацевтическим компонентом, позволяющим целенаправленно модифицировать свойства лекарственных средств. В одних случаях его фармакологическая активность лежит в основе терапевтического эффекта, в других – он выполняет вспомогательную функцию солеобразователя, обеспечивая пролонгированное высвобождение или химическую стабильность активного вещества. Такое двойственное положение сукцината в структуре лекарственных препаратов определяет необходимость дальнейшего изучения его

биологических эффектов, в том числе за пределами энергетического обмена.

1.2.2. Фармакокинетика сукцината после приема сукцинат-содержащих лекарственных препаратов

В настоящее время янтарная кислота широко используется в качестве пищевой добавки и входит в состав лекарственных препаратов. Однако, информация о фармакокинетике янтарной кислоты на сегодняшний день практически отсутствует.

Юнг Й. и соавт.(2022) изучили фармакокинетику янтарной кислоты-13C4 (13C4SA) после однократного ее внутривенного или перорального введения шести мышам линии ICR (самцы, 30 ± 5 г, 7–8 недель), которых разделили на 2 равные группы (Таблица 1). Первой группе вводили внутривенно янтарную кислоту-13C4 в дозе 10 мг/кг, второй – перорально в дозе 100 мг/кг, после чего через определенные временные точки забирали кровь из ретроорбитального венозного доступа, а у мышей второй группы так же отбирали образцы сердца, печени, почек, мозга, подкожной и бурой жировой ткани. В полученных образцах определяли концентрацию янтарной кислоты-13C4 методом масс-спектрометрии.

Таблица 1 – Фармакокинетические параметры янтарной кислоты-13C4 в плазме (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, $n = 3$). (Цит. по Jung Y., Song J. S., 2022) [100]

Фармакокинетические параметры	Янтарная кислота- 13C4	
	Внутривенно 10 мг/кг	Перорально 100мг/кг
T _{max} (ч)	0,08	0,25
C _{max} (нг/мл)	6226,7 $\pm$ 994,9	629,7 $\pm$ 33,5
T _{1/2} (ч)	0,56 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,21
AUC (нг*ч/мл)	2223,8 $\pm$ 349,4	322,5 $\pm$ 60,3
Cl (мл/ч/кг)	4574,5 $\pm$ 744,2	-
V _{ss} (мл/кг)	520,8 $\pm$ 88,8	-
F (%)	-	1,45

В данном исследовании фармакокинетика янтарной кислоты- $^{13}\text{C}_4$ характеризовалась высоким клиренсом (CL) и умеренным кажущимся объемом распределения (V_{ss}), что указывает на интенсивный метаболизм соединения и умеренную тканевую диффузию.

Несмотря на быструю абсорбцию после перорального введения, системная биодоступность (F) оставалась крайне низкой при сохранении линейности фармакокинетики, что указывает на ограниченную кишечную проницаемость и выраженный пресистемный метаболизм вследствие эффекта первого прохождения через печень.

Максимальное содержание экзогенного сукцината отмечалось в печени, далее следовала жировая ткань, почки. Минимальный уровень введенной янтарной кислоты отмечался в сердце и головном мозге [100].

Аль Хасан М.С. и соавт. (2025) при анализе фармакокинетических параметров сукцината, была выявлена его высокая гидрофильность, умеренная абсорбция, ограниченная проницаемость через ГЭБ и низкий уровень системной токсичности [142].

Янтарная кислота (0,300 г), входящая в состав цитофлавина, после его перорального приема проникает из желудочно-кишечного тракта в кровь и ткани, участвуя в реакциях энергетического обмена, и полностью распадается до конечных продуктов обмена (двуокиси углерода и воды) через 30 минут [51].

В открытом рандомизированном трехэтапном последовательном исследовании («CTF-amp-I-2019») оценивали фармакокинетический профиль действующих веществ (инозин, никотинамид, рибофлавин и янтарная кислота) препарата Цитофлавин при однократном внутривенном инфузионном введении в объеме 20,0 мл (1 мл содержит 100 мг янтарной кислоты) в разведении с различными растворителями со скоростью 4,0 мл/мин у здоровых добровольцев обоих полов в возрасте от 18 до 55 лет включительно. $C_{\max}$ янтарной кислоты составила 35,1 (29,9; 47,8) мкг/мл при введении в 5% растворе декстрозы и 35,5 (27,8; 53,5) мкг/мл при введении в 0,9% растворе натрия хлорида, $T_{1/2}$ составил 1,3 (0,4; 3,2) ч и 2,5 (0,4; 6,2) ч соответственно [52].

В ряде исследований было изучено возможное участие янтарной кислоты (сукцината) в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий.

Так в работе *in vitro* на объединенных микросомах печени человека было изучено влияние янтарной кислоты (100 мкМ) на активность восьми изоформ CYP450 (1A2, 3A4, 2A6, 2E1, 2D6, 2C9, 2C19 и 2C8). Янтарная кислота проявляла концентрационно-зависимое ингибирующее действие в отношении ключевых изоформ цитохрома P450 – CYP3A4, CYP2D6 и CYP2C9. Были выявлены различия в механизмах ингибирования: по отношению к CYP3A4 янтарная кислота действовала как неконкурентный ингибитор, тогда как в случае CYP2D6 и CYP2C9 наблюдалось конкурентное ингибирование. Последнее может быть обусловлено структурным сходством янтарной кислоты с эндогенными субстратами указанных изоферментов, что обеспечивает конкуренцию за активный центр фермента. Эти данные свидетельствуют о потенциальном риске фармакокинетических лекарственных взаимодействий при совместном применении янтарной кислоты с препаратами, являющимися субстратами CYP3A4, CYP2D6 или CYP2C9. В связи с этим рекомендуется соблюдать осторожность при комбинированной терапии янтарной кислотой и лекарственными средствами с узким терапевтическим индексом, метаболизирующимися преимущественно через указанные изоформы цитохрома P450 [143].

При изучении совместного применения янтарной кислоты и ирбесартана *in vivo* и *in vitro*, янтарная кислота увеличивала системную экспозицию ирбесартана за счет ингибирования CYP2C9 [118], что указывает на клинически значимое фармакокинетическое взаимодействие, требующее коррекции дозы ирбесартана или фармакологического мониторинга при его совместном применении с янтарной кислотой.

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что янтарная кислота является полноценным фармакологическим агентом, быстро абсорбируется в желудочно-кишечном тракте, распределяется по органам и тканям, подвергается

выраженному метаболизму и быстрой элиминации, а также может влиять на активность изоферментов семейства цитохрома P450.

1.3. Мексидол: фармакокинетика и фармакодинамика

1.3.1. Мексидол – основные фармакологические эффекты

Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) – оригинальный российский лекарственный препарат, разработанный в НИИ фармакологии РАМН в середине 80-х годов [14] и зарегистрированный на территории РФ в 1996 году. В состав Мексидола входят два функционально значимых, активных химических соединения: 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин и сукцинат (янтарная кислота). Сочетание этих веществ обеспечивает высокую биодоступность и широкий спектр терапевтического действия [14].

Считается, что эффекты Мексидола реализуются на трех уровнях: нейрональном, сосудистом и метаболическом. Он оказывает нейропротекторное, антиоксидантное, противогипоксическое, противоишемическое, ноотропное, вегетотропное, антистрессорное, анксиолитическое, противосудорожное, антиалкогольное, кардиопротекторное, антиатерогенное, сахароснижающее, геропротекторное действие [13, 57, 59].

Как и предполагалось при создании молекулы, антигипоксическое действие в препарате реализуется за счет сукцината, который поддерживает работу сукцинатоксидазного звена цикла Кребса в условиях недостатка кислорода [25].

2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин, входящий в состав Мексидола, обладает прямой антиоксидантной активностью, что неоднократно доказано в ряде исследований *in vitro* [57]. Это обусловлено наличием в его молекуле подвижного атома водорода, связанного с кислородом, т.е. по механизму действия он относится к донаторам протона. Также установлено, что Мексидол способен повышать активность антиоксидантных ферментов супероксид-

дисмутазы и селен-зависимой глутатионпероксидазы [54].

Установлено, что Мексидол может также хелатировать Cu(II), что полностью подавляет восстановление Cu(II) аскорбиновой кислотой и снижает скорость реакции восстановления $O_2^{\cdot-}$, и таким образом предотвращает генерацию свободных радикалов [153].

За последнее время изучены и новые механизмы действия Мексидола, объясняющие его полимодальное действие и высокую клиническую эффективность.

На крысах-самцах wistar было показано, что курсовое в течение 14 сут внутрижелудочное введение Мексидола в дозе 100 мг/кг при моделировании ишемии головного мозга крыс в префронтальной коре вызывает повышение уровня транскрипционного фактора Nrf2 (*англ.: NF-E2-related factor 2*), регулирующего редокс гомеостаз [7], а также альфа субъединицы фактора индуцируемого гипоксией HIF-1 α , одного из основных факторов, обеспечивающих адаптацию клеток к гипоксии [8].

На крысах-самцах wistar было показано, что внутривенное введение Мексидола в дозе 50 мг/кг массы после 60 мин окклюзии средней мозговой артерии в момент реперфузии вызывало более значимое повышение уровня нейротрофических факторов IGF-1 (*англ.: insulin-like growth factor 1*), NGF (*англ.: nerve growth factor*), BDNF (*англ.: brain-derived neurotrophic factor*) и VEGF (*англ.: vascular endothelial growth factor*) в ишемизированной области головного мозга по сравнению с введением физраствора, что приводило к усилению нейрорегенерации [6].

Курсовое введение Мексидола молодым (3 мес) и стареющим (6, 9, 12 и 15 мес) аутбредным крысам-самцам в дозах 40 и 100 мг/кг сопровождалось дозозависимой индукцией сукцинатного рецептора SUCNR1 и белков-маркеров биогенеза митохондрий: транскрипционного коактиватора PGC-1 α (*англ.: peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), транскрипционных факторов (NRF1, TFAM (*англ.: mitochondrial transcription factor A*)), каталитических субъединиц дыхательных ферментов NDUFV2

(англ.: *NADH dehydrogenase ubiquinone flavoprotein 2*), SDHA (англ.: *succinate dehydrogenase flavoprotein subunit A*), cyt b (англ.: *cytochrome b*), COX2 (англ.: *cytochrome c oxidase subunit 2*) и АТФ-синтазы (*ATP5A*, англ.: *alpha subunit F1 of ATP synthase*) в коре головного мозга [22].

Предполагается, что сукцинат, входящий в состав Мексидола, также может оказывать фармакологические эффекты, обусловленные его воздействием на SUCNR1, однако эксперименты, в которых бы проверялась данная гипотеза, практически не проводились. В одном лишь исследовании, выполненном в лаборатории клеточных технологий ФГБОУ ВО РязГМУ *in vitro*, было показано, что Мексидол, действуя на SUCNR1, может стимулировать миогенную дифференцировку мышечных миобластов C2C12 [9, 28].

Таким образом, возможность сукцината, входящего в состав Мексидола, воспроизводить фармакологические и биохимические эффекты янтарной кислоты (сукцината) за счет влияния на SUCNR1, является малоизученной.

1.3.2. Фармакокинетика этилметилгидроксипиридина, входящего в состав Мексидола

Фармакокинетика этилметилгидроксипиридина, входящего в состав Мексидола, детально изучена в доклинических и клинических исследованиях.

При изучении фармакокинетики Мексидола на крысах wistar было показано, что после внутрижелудочного введения с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы этилметилгидроксипиридин быстро всасывается и распределяется в органы и ткани, достигая своей максимальной концентрации через 30-60 минут в плазме крови, гомогенате мозжечка и таламуса, а через 60-90 минут в гомогенате коры больших полушарий и продолговатого мозга. В течение последующих 3-4 часов его концентрация постепенно снижается и через 5 часов после введения концентрация этилметилгидроксипиридина находится на минимальном уровне. Также показано, что Мексидол способен проникать в цитоплазматическую и митохондриальную фракции коры больших полушарий головного мозга с

максимальной концентрацией через 1,5 часа после перорального введения препарата [58].

В исследовании на кроликах породы Советская шиншилла показано, что при внутрижелудочном введении Мексидола в дозе 100 мг/кг массы этилметилгидроксипиридин также быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта. Максимальная концентрация препарата достигается в среднем через 30 минут после внутрижелудочного введения, а затем постепенно снижается, и через 5 ч после введения детектируется на минимальном уровне [58].

При внутримышечном введении Мексидола в дозе 400–500 мг его максимальная концентрация в плазме крови людей достигается в среднем через 0,58 часа, среднее время удержания составляет 0,7–1,3 часа, а уже через 4 часа препарат в плазме крови добровольцев практически не регистрируется [54]. При пероральном приеме в аналогичной дозе время удержания препарата в организме составляет 4,9–5,2 часа [16].

При изучении биотрансформации этилметилгидроксипиридина было идентифицировано 5 его метаболитов. Первый – 2,6-диметил-3-оксипиридин образуется в больших количествах и обладает такой же анксиолитической активностью, как исходная молекула; второй – 6-метил-3-оксипиридин; третий – фосфатный конъюгат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина; четвертый – глюкуроноконъюгат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина; пятый – фосфатно-глюкуроновый конъюгат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина [16, 42, 54]. У человека биотрансформация этилметилгидроксипиридина протекает в печени в основном путем глюкуроноконъюгирования. Показатели экскреции Мексидола и его метаболитов имеют выраженную вариабельность у отдельных пациентов. Препарат выводится преимущественно почками, в среднем за 12 часов с мочой экскретируется 0,3% неизмененного вещества и 50% введенной дозы в виде глюкуроноконъюгата. Наиболее интенсивно экскреция происходит в течение первых 4 часов после приема [16, 21].

В ряде исследований было оценено возможное участие Мексидола в развитии фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне

изоферментов семейства цитохромов P450 и ряда белков-транспортеров.

В исследовании на добровольцах при оценке соотношения 6 β -гидроксикортизол/свободный кортизол в образцах мочи было показано, что Мексидол повышает активность изофермента 3A4 цитохрома P450 [10].

В исследованиях *in vitro* на клетках линии Caco-2 и в экспериментах *in vivo* на кроликах породы Советская шиншилла выявлено, что этилметилгидроксипиридин не является субстратом Pgp, однако введение Мексидола ингибирует его активность [30].

В исследовании *in vitro* также на клеточной линии Caco-2 выявлено, что этилметилгидроксипиридин не является субстратом другого ABC-транспортера – BCRP и является его ингибитором [48].

На трансфицированных клетках HEK293-OATP1B1 (*англ.: Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1*) установлено, что этилметилгидроксипиридин не является субстратом транспортера OATP1B1, однако в больших концентрациях, превышающих терапевтические, может вызывать снижение его активности [82].

При этом, фармакокинетика сукцината, входящего в состав Мексидола, на данный момент не изучена. В доступной литературе отсутствуют данные о всасывании, распределении по органам и тканям и выведении сукцината после разных способов введения Мексидола. Также нет данных о связи фармакокинетики и фармакодинамики сукцината после введения Мексидола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сукцинат является важнейшим эндогенным метаболитом, участвующим в функционировании цикла Кребса и дыхательной цепи митохондрий. Влияя на свои специфические рецепторы SUCNR1, сукцинат регулирует многочисленные процессы в живом организме. Учитывая данные обстоятельства, янтарная кислота широко используется как фармакологический агент, а SUCNR1 – как перспективная фармакологическая мишень.

Одним из наиболее известных сукцинатсодержащих лекарственных

препаратов является оригинальный российский лекарственный препарат Мексидол – этилметилгидроксипиридина сукцинат. Фармакокинетика и фармакодинамика этилметилгидроксипиридина подробно изучена в доклинических и клинических исследованиях. В то же время, практически отсутствуют данные о фармакокинетики сукцината, в частности о его всасывании, распределении по органам и тканям и выведении после разных способов введения Мексидола. Также нет данных о связи фармакокинетики и фармакодинамики сукцината после введения Мексидола. На ликвидацию данных пробелов в знаниях и направлено настоящее исследование.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Исследования *in vitro*

2.1.1. Клеточная линия

Исследование выполнено на линии клеток Caco-2 (англ.: colon adenocarcinoma clone 2, аденокарцинома толстой кишки человека) и линии клеток HepG2 (англ.: Hepatic cell line G2, гепатоцеллюлярная карцинома человека), которые были получены из коллекции клеточных линий ФГБУН ИНЦ РАН (Санкт-Петербург). Линия клеток Caco-2 использовалась для изучения абсорбции сукцината при добавлении Мексидола, а линия клеток HepG2 – для изучения влияния Мексидола на SUCNR1 и проникновения сукцината внутрь клеток.

2.1.2. Культивирование клеток

Клетки линий Caco-2 и HepG2 культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в ДМЕМ с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) («Sigma-Aldrich», Германия), содержащей L-глутамин (4 мМ) («Sigma-Aldrich», Германия), 15% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («Sigma-Aldrich», Германия) соответственно. После достижения 70-90% конфлюентности клетки снимали с фласка добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия) [49] и высевали клетки Caco-2 в 12-лучный планшет со вставками с полупроницаемыми мембранами – трансвеллы, а клетки HepG2 – в 6 луночный планшет.

Клетки Caco-2 культивировали в течение 21 сут, когда происходит их спонтанная дифференцировка в поляризованные энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Pgp [49, 73, 83].

Клетки линии HepG2 использовали в экспериментах при достижении

монослоя [49].

На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения ($n=3$).

2.1.3. Изучение абсорбции сукцината, входящего в состав Мексидола, *in vitro* на клетках линии Caco-2

Абсорбцию сукцината, входящего в состав Мексидола, *in vitro* на клетках линии Caco-2 анализировали в трансвеллах.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления, которое определяли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 (“Millipore”, США). При его значении выше 500 мОм×см² выполняли транспортные эксперименты [146].

Для этого питательную среду заменяли на раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия), забуференный 25 мМ Хепес при pH 7,4 («Sigma-Aldrich», Германия) с содержанием 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) (транспортная среда) [48]. Затем добавляли Мексидол в апикальную камеру в конечной концентрации 250 мкМ и через 1, 2 и 3 часа забирали по 50 мкл образцов из базолатеральной камеры для определения концентрации сукцината (*a-b* транспорт).

Затем в других трансвеллах оценивали транспорт сукцината из базолатеральной камеры в апикальную (*b-a* транспорт). Для этого Мексидол в той же концентрации 250 мкМ добавляли в базолатеральную камеру и через 1, 2 и 3 часа забирали по 50 мкл образцов из апикальной камеры для определения концентрации сукцината.

Транспорт сукцината как из камеры *a* в камеру *b*, так и обратно оценивали по формуле [159]:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{(AC_0)} \quad (1)$$

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient),

dQ/dt – изменение концентрации субстрата в камере реципиенте за время

инкубации,

A – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе, на которой культивировали клетки,

C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре.

Затем рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости: $b-a$ к $a-b$.

$$\text{Отношение коэффициентов} = \frac{P_{app} b-a}{P_{app} a-b} \quad (2)$$

2.1.4. Оценка влияния сукцината, входящего в состав Мексидола, на SUCNR1 и его проникновения внутрь клеток линии HepG2

Для оценки влияния сукцината, входящего в состав препарата Мексидол, на SUCNR1 клетки линии HepG2 инкубировали с Мексидолом в концентрации 100 мкМ, а для оценки его проникновения внутрь клеток – в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ. Инкубацию проводили в течение 15, 30 и 60 минут.

После завершения инкубации клетки снимали и в их лизате определяли концентрацию сукцината и инозитолмонофосфата.

2.1.5. Определение концентрации инозитолмонофосфата в лизате клеток HepG2

Концентрацию инозитолмонофосфата в клеточном лизате анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Белки осаждали добавлением к образцу ацетонитрила в соотношении 1:1. Хроматографическое разделение проводили на колонке UCT Selectra (C18 4,6 мм * 100 мм, 5 мкм, 100 Å) с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-418 18GDC46-5UM с использованием раствора 10 мМ формиата аммония в качестве подвижной фазы А и метанола в качестве подвижной фазы Б. Программа градиента подвижной фазы А/Б: 0,0 минут – 80%/20%; 2,5 минуты – 30%/70%; 2,5 минуты – 80%/20%. Объем вводимой пробы – 30 мкл. Время

анализа – 8 минут. В данных условиях время удерживания инозитолмонофосфата составило 2,2-2,23 минуты.

Ионизацию молекул инозитолмонофосфата проводили в негативном (отрицательном) режиме электроспрея при атмосферном давлении и напряжении 3000 В. Для количественного анализа использовали оптимизированный режим мониторинга селективных реакций (SRM, *англ.: selected reaction monitoring*) со следующими параметрами: 259 m/z → 79 m/z (использовался для количественного анализа), энергия столкновения 20 эВ; 259 m/z → 97,1 m/z, энергия столкновения 20 эВ. Полученные результаты выражали в нг/мг белка. Концентрацию белка в образцах определяли методом Бредфорда с использованием коммерческого набора Pierce Coomassie Plus Bradford Assay Kit («ThermoFisher», США).

2.1.6. Определение концентрации фексофенадина в транспортной среде

Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом ВЭЖХ-УФ на хроматографе «Стайер» (Россия) при длине волны 220 нм с использованием хроматографической колонки Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 мм x 4,6 мм, 4 мкм). Температура разделения – 35°C. Скорость потока – 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: ацетонитрил (128 мл), вода деионизированная (267,4 мл), кислота уксусная ледяная (6,33 мл), триэтиламин до pH=6,7 в изократическом режиме. Время удерживания фексофенадина составило 12,8 мин.

Образцы транспортной среды (50 мкл), содержащие фексофенадин, разводили в 150 мкл подвижной фазы, и 100 мкл полученного раствора вводили в хроматограф. Аналитический диапазон методики составил 1,2–57,4 мкМ [56].

2.1.7. Определение концентрации метотрексата в транспортной среде

Анализ выполняли на ВЭЖХ-МС/МС Ultimate 3000-TSQ Fortis («ThermoFisher», США) с использованием хроматографической колонки UCT Selectra C18 4,6 mm×100 mm 5 um, 100A, предколонки Selectra C18 Guard

Cartridges SLC-18GDC46-5UM при температуре 35 °C.

Состав подвижной фазы был следующим: соотношение раствора муравьиной кислоты 0,1% / ацетонитрил – 0,0 мин 75% / 25%; 0,4 мин – 60% / 40%; 6,0 мин – 20% / 80%; 8,0 мин – 75% / 25% при скорости 0,3 мл/мин. Время анализа – 10 мин. В данных условиях время удерживания метотрексата составило 3,11 мин.

Объём вводимой пробы составил 2 мкл. Ионизацию молекул проводили в режиме ESI+. Режим детектирования: sheath gas (оболочечный газ) – 35 л/мин, aux gas (вспомогательный газ) – 7 л/мин, sweep gas (продувочный газ) 0 л/мин, температура трубки для переноса ионов – 300 °C, температура испарителя – 350°C. Детекцию метотрексата проводили в режиме MRM: 455,15 m/z → 308,125 m/z, энергия столкновения – 22,99 В, фрагментация источника – 5, CID gas – 2 мТорр.

Для пробоподготовки биообразцов к 50 мкл транспортной среды добавляли 950 мкл смеси метанол : вода (соотношение 1:1), перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия), центрифугировали в течение 10 мин при скорости 13000 g (Avanti JXN-3 Beckman Coulter, «Beckman Coulter», США). Супернатант переносили в вials объёмом 1 мл и помещали в автосамплер. В работе использовали следующие калибровочные стандарты: 60, 100, 200, 600, 1000, 2000 и 10 000 нмоль/л [39].

2.1.8. Определение внутриклеточной локализации SUCNR1 в клетках линии HepG2

Для оценки внутриклеточной локализации SUCNR1 в клетках линии HepG2 выполняли иммуноцитохимическое исследование. Для этого клетки культивировали в 96-луночных планшетах. Клетки фиксировали охлажденным до -20°C метанолом (15 минут), пермеабелизировали мембрану 0,1% раствором Тритона X-100 (15 минут), блокировали 1% раствором бычьего сывороточного

альбумина («CDH», Индия) в фосфатном буфере («Bio-Rad», США) с содержанием 0,1% Tween-20 («Sigma-Aldrich», Германия)) в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее клетки инкубировали с первичными кроличьими поликлональными антителами к SUCNR1 (A08485, Boster, Китай) в течение ночи при +4 °С. Визуализацию первичных антител осуществляли с помощью вторичных козлиных антител против белка кролика (S0018 Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Fluor488-conjugated, «Affinity Biosciences», КНР), которые инкубировали с клетками в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре.

Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus CKX-53 («Olympus», Япония) при увеличении в 400 раз.

2.2. Исследования *in vivo*

2.2.1. Экспериментальные животные

В качестве тест-системы в исследованиях *in vivo* использовали 95 половозрелых крыс-самцов wistar массой 280–320 г. Крысы были получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий федерального медико-биологического агентства» филиал «Столбовая» (РФ, Московская обл., Чеховский район, рп. Столбовая, Мира ул., владение 1а) и имели необходимые ветеринарные свидетельства. В исследовании использовались животные без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим вивария ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в течение 14 дней. В ходе эксперимента животных содержали в «чистой» зоне вивария при температуре 19 – 22°C, 12-часовом искусственном освещении, на подстиле из опилок деревьев лиственных пород. Кормление осуществляли *ad libitum* при свободном доступе к воде.

Экспериментальные исследования осуществляли в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 года N199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Протокол

исследования был рассмотрен и утвержден на заседании Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, выписка № 11 от 29.01.2018 г.

Животные содержались по 5 особей в клетках Тип-4 (1815 кв. см) на подстиле. Поликарбонатные клетки оборудовались стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальными разделителями для корма и стальными держателями этикеток.

Животных распределяли по группам с применением принципа рандомизации, используя в качестве критерия массу тела так, чтобы средняя масса тела животных к первому дню введения статистически не отличалась между группами. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, в соответствии с которым животному ставилась метка проколом ушной раковины.

Корм Чара для содержания конвенциональных мелких грызунов (00-00000228) (ООО «Фаворит», РФ, Московская обл., Сергиево-Посадский район, г. Сергиев Посад, д. Тураково, д. 113 А) давался *ad libitum* в кормовое углубление крышки клетки. Специально подготовленная вода Гейзер Престиж («Гейзер»), Reverse Osmosis Water Storage Pressure Tank RO-122 («Oceanic Water Systems») давалась *ad libitum* в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках со стальными крышками-носиками. Подготовка воды обеспечивает отсутствие контаминации, способной повлиять на результаты исследования. Накануне вечером животные лишались корма при свободном доступе к воде.

70 крыс использовались для оценки фармакокинетики сукцината после его внутривенного (n=35) и внутрижелудочного введения (n=35). 5 животных служили контролем (им внутривенно вводился физиологический раствор в эквивалентном объеме). 20 животных использовались для разработки и валидации методики определения сукцината в плазме крови и цитоплазматической и митохондриальной фракциях органов методом ВЭЖХ-МС/МС.

2.2.2. Исследование фармакокинетики сукцината после внутривенного введения Мексидола

Мексидол, раствор для внутривенного и внутримышечного введения 50 мг/мл (АО "Армавирская биофабрика", Россия, серия 070520), вводили животным внутривенно в хвостовую вену в дозе 100 мг/кг (в пересчете на человека 70 кг по площади поверхности тела – 1186 мг). Через 1, 5, 10, 15, 30 минут, 1 и 1,5 часа (7 временных точек) после инъекции животные выводились из эксперимента передозировкой Золетила в дозе 30 мг/кг («Золетил 100», Vibrac SA, Франция). Из бифуркации аорты в гепаринизированные пробирки забиралась кровь, также забирались образцы коры больших полушарий, миокарда левого желудочка сердца и печени. Для получения плазмы кровь центрифугировали при 800 g в течение 10 минут. На каждую временную точку приходилось по 5 животных. 5 животных использовались в качестве контроля (им вводился физиологический раствор в эквивалентном объеме) для оценки базового уровня сукцината в плазме крови и цитоплазматической и митохондриальной фракциях органов.

2.2.3. Исследование фармакокинетики сукцината после внутрижелудочного введения Мексидола

Мексидол, таблетированная лекарственная форма, 125 мг (ЗАО «ЗиО-Здоровье», Россия, серия 920320), вводили животным внутрижелудочно через зонд в дозе 100 мг/кг массы (в пересчете на человека 70 кг – 1186 мг). Через 1, 5, 10, 15, 30 минут, 1 и 1,5 часа (7 временных точек) после введения животных выводили из эксперимента передозировкой Золетила в дозе 30 мг/кг («Золетил 100», Vibrac SA, Франция). Из бифуркации аорты в гепаринизированные пробирки забиралась кровь, также забирались образцы коры больших полушарий, миокарда левого желудочка сердца и печени. Для получения плазмы кровь

центрифугировалась при 800 g в течение 10 минут. На каждую временную точку приходилось по 5 животных.

2.2.4. Выделение цитоплазматической и митохондриальной фракций органов

Образцы органов промывались в физиологическом растворе при +4 °C, затем их навеска помещалась в 0,25 М раствор сахарозы из расчета 1:10 по массе. Гомогенат готовился с помощью гомогенизатора POTTER-ELVENJEM (8-10 ударов), после предварительного измельчения навески органов ножницами на холоде.

Полученные гомогенаты центрифугировались 10 минут при 800 g (центрифуга CM-6M ELMi, Латвия) для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочная жидкость отбиралась в отдельные пробирки и центрифугировалась 15 минут при 14000 g для осаждения митохондрий. Супернатант представлял собой цитоплазматическую фракцию клеток. Митохондриальную фракцию ресуспендировали в среде выделения, с добавлением 0,1% тритона X-100 для разрушения мембран. Все описанные манипуляции осуществлялись при температуре не выше +4°C. Полученные образцы замораживались при -80°C и хранились до анализа в ультранизкотемпературном медицинском морозильнике Sanyo MDF-192 («Sanyo», Япония). В полученных цитоплазматической и митохондриальной фракциях органов, а также в плазме крови определялось содержание сукцината.

2.3. Метод определения концентрации сукцината в биологических образцах

Концентрацию сукцината в плазме крови крыс/модельной матрице определяли методом ВЭЖХ-МС/МС на хроматографе Ultimate 3000 и МС/МС детекторе TSQ Fortis («Thermo Fisher Scientific», США). Управление совмещённой системой ВЭЖХ-МС/МС и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)».

Условия хроматографического анализа были следующими.

Колонка UCT Selectra C18 4,6 mm *100 mm 3um, 100A, предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, температура разделения 40 °C.

Скорость подвижной фазы составила 0,5 мл/мин при температуре 35°C, объём вводимой пробы – 5 мкл.

Использовали градиентный режим элюирования по следующей программе (Таблица 2).

Таблица 2 – Соотношение компонентов подвижной фазы в зависимости от времени, прошедшего с начала хроматографического анализа

Время, мин	0,1% водный раствор муравьиной кислоты (раствор А)	муравьиная кислота 0,1% с метанолом (раствор Б)
0 мин	90%	10%
0,01 мин	70%	30%
3,5 мин	50%	50%,
3,5 мин	10%	90%
5 мин	10%	90%
5 мин	90%	10%
7,5 мин	90%	10%

В данных условиях время удерживания сукцината составило 3,76-3,82 минут, хлорамфеникола – 7,12-7,18 минут.

Ионизацию молекул сукцината проводили в режиме негативной (отрицательной) ионизации на электроспрее при атмосферном давлении и напряжении 2500 В. Режим детектирования: sheath gas (фокусирующий газ) 50 Arb (отн.ед.), aux gas (вспомогательный газ) 10 Arb (отн.ед.), sweep gas (экранирующий газ) 1 Arb (отн.ед.), температура трансферного капилляра 300°C, температура испарителя 350°C.

Детектирование анализируемых веществ проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM, *англ.: Multiple Reaction Monitoring*)

при следующих условиях: $117\text{ m/z} \rightarrow 98,7\text{ m/z}$ при энергии столкновения 10 эВ, $117\text{ m/z} \rightarrow 73,1\text{ m/z}$ при энергии столкновения 10 эВ. Параметр напряжения фрагментации в источнике (Source CID) был установлен на уровне 5 В, давление аргона (диссоциирующий газ) – 1,5 мТорр. Переходы масс для внутреннего стандарта хлорамфеникола: $321,1\text{ m/z} \rightarrow 152,1\text{ m/z}$ при энергии столкновения 17 эВ, $321,1\text{ m/z} \rightarrow 176,1\text{ m/z}$ при энергии столкновения 21 эВ.

Концентрация сукцината оценивалась методом внутреннего стандарта по площади пиков.

Валидация биоаналитической методики выполнялась согласно Руководству по экспертизе лекарственных средств (Том I), правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, руководствам EMA Guideline on bioanalytical method validation, 2011 и FDA Guidance for Industry: Bioanalytical method validation (draft guidance). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2013, ICH M10 guideline on bioanalytical method validation and study sample analysis, July 2022 по следующим параметрам: специфичность; линейность; правильность; прецизионность; нижний предел количественного определения; перенос пробы; стабильность сукцината; матричный эффект; эффект разбавления; извлечение.

Полученные валидационные характеристики представлены в разделе «результаты».

2.4. Статистический анализ

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «StatSoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и Microsoft Excel for MAC ver. 16.24 (ID 02984-001-000001). Распределение данных оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные в таблицах и на графиках представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения при

нормальном распределении данных ($M \pm SD$) и медианы, минимального и максимального значения ($Me (min; max)$) – при распределении данных отличным от нормального. Достоверность полученных различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) и критерия Фишера для парных сравнений при нормальном распределении и критерия Крускала-Уоллиса с последующим попарным сравнением с помощью критерия Манна-Уитни при ненормальном распределении. Статистически значимыми считали различия при значении $p < 0,05$.

При оценке фармакокинетики сукцината после внутривенного и внутривенного введения препарата Мексидол модельно-независимым методом рассчитывались следующие фармакокинетические параметры: C_{max} – максимальная концентрация, T_{max} – время достижения максимальной концентрации, $T_{1/2}$ – период полувыведения, AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от 0 до временной точки последнего забора крови, $AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от 0 до бесконечности, MRT – среднее время удерживания, V_d – кажущийся объем распределения, Cl – общий клиренс, K_{el} – константа элиминации.

Определение компартментности (камерности) фармакокинетической модели сукцината выполняли с помощью программы Kinetica 5.1. («InnaPhase Corporation», «ThermoFisher», США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Разработка и валидация методики количественного определения сукцината в плазме крови крыс

Матрица и пробоподготовка

На хроматограммах образцов холостой плазмы крови крыс наблюдался пик со временем удерживания, соответствующим времени удерживания сукцината, что свидетельствовало о наличии эндогенного сукцината в плазме крови животных. Были предприняты попытки устранения эндогенного сукцината (в ходе биохимической реакции превращения сукцината в сукцинил-CoA (Succinate Assay Kit (Colorimetric), Abcam ab204718) и твердофазной экстракцией), однако они не привели к полному избавлению от сукцината. Поэтому в дальнейшем для определения нижнего предела количественного определения, правильности и прецизионности использовалась модельная матрица.

Модельную матрицу готовили следующим образом. К 1,8 мл плазмы добавляли 8 мл этилацетата («Химмед», Россия), перемешивали на вортексе и инкубировали на шейкере в течение 15 мин. Полученный экстракт центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Органическую фазу упаривали в токе азота при 40°C. Полученный осадок растворяли в 1,8 мл 10% бычьего альбумина («Sigma-Aldrich», Германия), разведённого на физиологическом растворе.

Приготовление калибровочных растворов осуществляли следующим образом. Из маточного метанольного раствора сукцината 1 мг/мл готовили водный раствор с концентрацией 100 мкг/мл. Из полученного раствора готовили следующие калибровочные стандарты сукцината в модельной матрице: 20 000 нг/мл, 10 000 нг/мл, 6000 нг/мл, 2000 нг/мл, 1000 нг/мл, 600 нг/мл и 200 нг/мл. В качестве образцов контроля качества использовали следующие растворы сукцината: 16000 нг/мл, 10000 нг/мл, 600 нг/мл и 200 нг/мл. Полученные растворы

хранили в холодильнике при температуре от +4°C до +6°C.

Для пробоподготовки биообразцов или модельной матрицы использовали метанол с содержанием в качестве внутреннего стандарта хлорамфеникола («Dr Ehrenstorfer», Германия) в концентрации 10 нг/мл, добавляемый в количестве 600 мкл на 200 мкл образца. Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 1 минуты, затем центрифугировали при 13 000 g (Avanti JXN-3 «Beckman Coulter», США) в течение 10 минут при 4°C по Цельсию. 600 мкл надосадочной жидкости переливали пипеткой в промаркированные виалы и помещали в автосемплер для последующего анализа.

На хроматограммах образцов модельной матрицы не наблюдалось пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания сукцината и хлорамфеникола (внутреннего стандарта). При добавлении сукцината к плазме крови крыс отмечалось увеличение пика, соответствующего по времени удерживания пику эндогенного сукцината, дополнительные пики не обнаруживались. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на Рисунках 3-5.

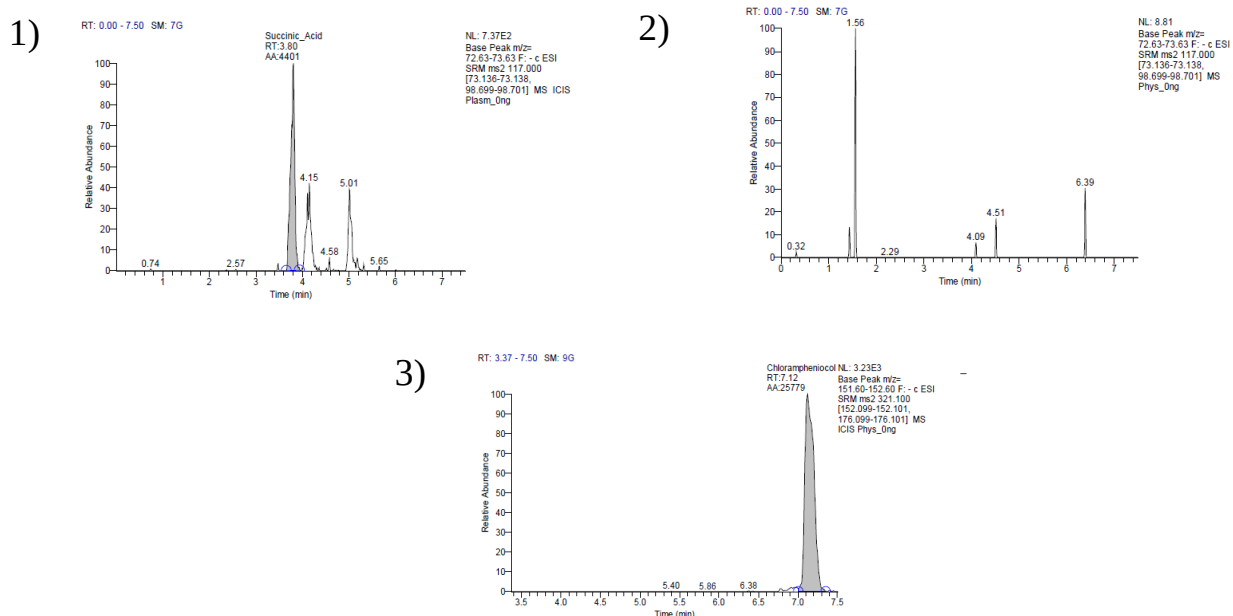


Рисунок 3 – Типовые хроматограммы матриц

Примечание – 1 – Хроматограмма образца холостой плазмы крови, 2 – Хроматограмма модельной матрицы, 3 – Хроматограмма модельной матрицы с прибавлением внутреннего стандарта хлорамфеникола до концентрации 10 нг/мл

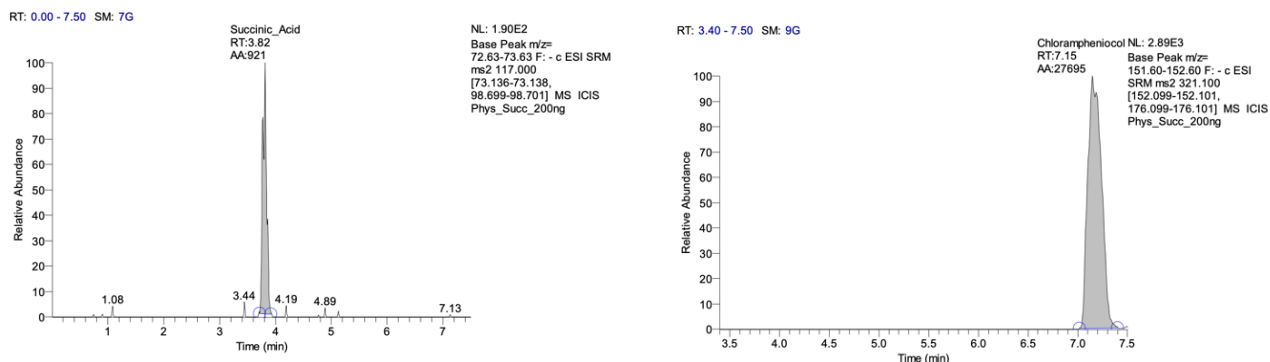


Рисунок 4 – Хроматограмма модельной матрицы с прибавлением сукцината до концентрации 200 нг/мл и внутреннего стандарта хлорамфеникола до концентрации 10 нг/мл

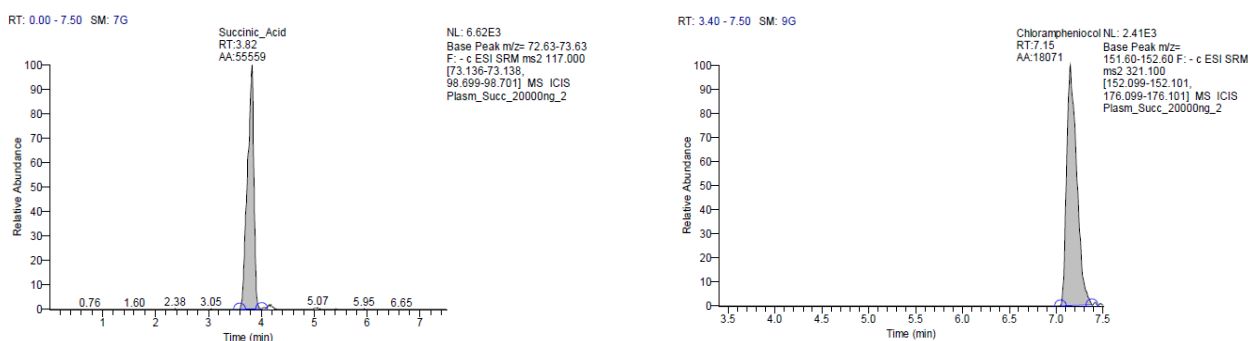


Рисунок 5 – Хроматограмма образца холостой плазмы крови с прибавлением сукцината до концентрации 20 000 нг/мл и внутреннего стандарта хлорамфеникола до концентрации 10 нг/мл

Нижний предел количественного определения (НПКО)

Учитывая наличие сукцината в холостой матрице, для расчета нижнего предела количественного определения (НПКО) использовали модельную матрицу.

НПКО методики устанавливали на основе результатов оценки линейности, правильности и прецизионности. НПКО для сукцината в исследуемой модельной среде служила наименьшая концентрация, находящаяся в зоне линейного отклика детектора. При этом допустимые погрешности по правильности и прецизионности не превышали 20%. Установленная величина НПКО для целевого компонента равнялась 200 нг/мл. На рисунке 4 представлена хроматограмма,

соответствующая данной концентрации сукцината в матрице. Отношение аналитического сигнала к уровню шума для этой точки составило не менее 6. Чувствительность метода (предел обнаружения) сукцината достигает примерно 50 нг/мл, где соотношение сигнал/шум фиксировалось на уровне около 3.

Линейность

Проводили анализ 7 образцов модельной матрицы и холостой плазмы крови с прибавлением рабочих растворов сукцината до получения концентраций: 200, 600, 1000, 2000, 6000, 10 000 и 20 000 нг/мл и рабочего раствора хлорамфеникола (внутреннего стандарта) до концентрации 10 нг/мл.

Используя полученные значения, строили калибровочные графики, где по оси Y было отношение площади пика сукцината к площади пика хлорамфеникола, а по оси X концентрация сукцината в модельной матрице (Рисунок 6) и в плазме крови (Рисунок 7).

Рассчитанные коэффициенты корреляции были в пределах требуемых значений (не менее 0,99).

Образцы хроматограмм представлены на Рисунке 8.

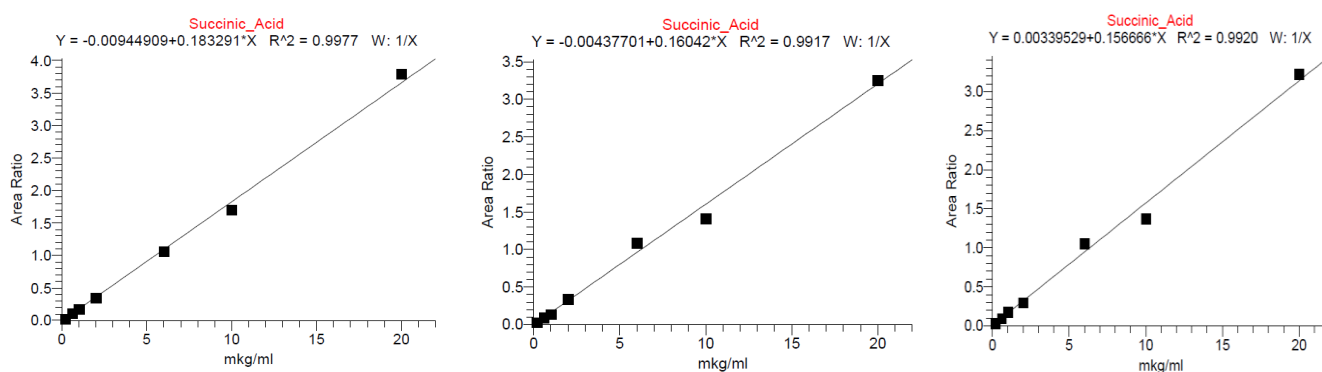


Рисунок 6 – Графики зависимости отношения площади пика сукцината к площади пика хлорамфеникола от концентрации сукцината в модельной матрице

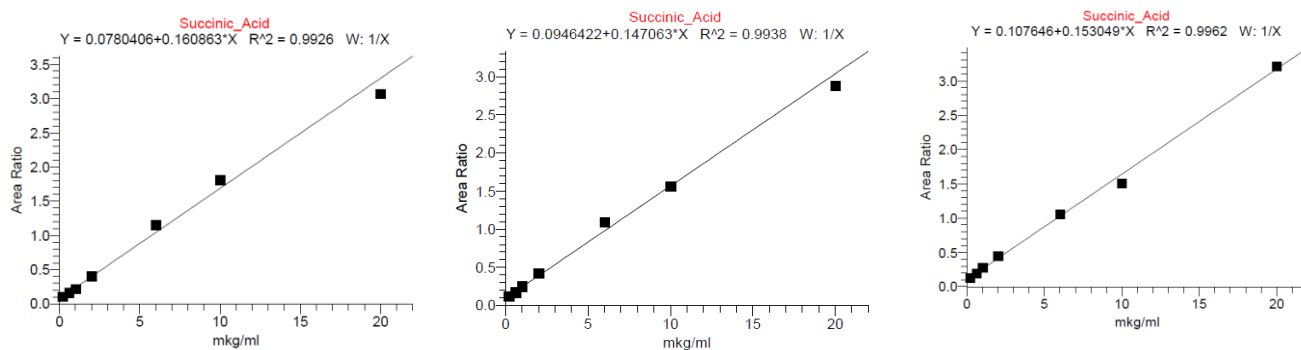


Рисунок 7 – Графики зависимости отношения площади пика сукцината к площади пика хлорамфеникола от концентрации сукцината в плазме крови

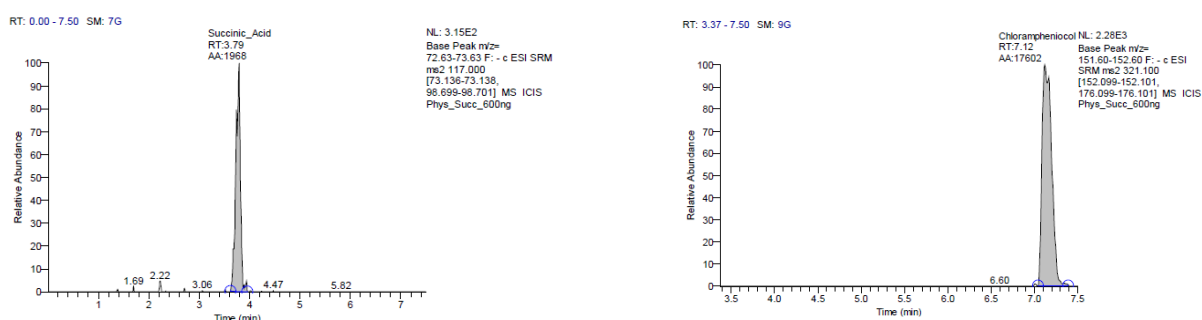


Рисунок 8 – Хроматограмма модельной матрицы с прибавлением сукцината до концентрации 600 нг/мл и внутреннего стандарта хлорамфеникола до концентрации 10 нг/мл

Угол наклона калибровочных графиков на модельной матрице, соответствовал углу наклона калибровочных графиков на плазме (Таблица 3), то есть калибровочные кривые практически совпадали (Рисунок 9), что подтверждает возможность использовать модельную матрицу [124].

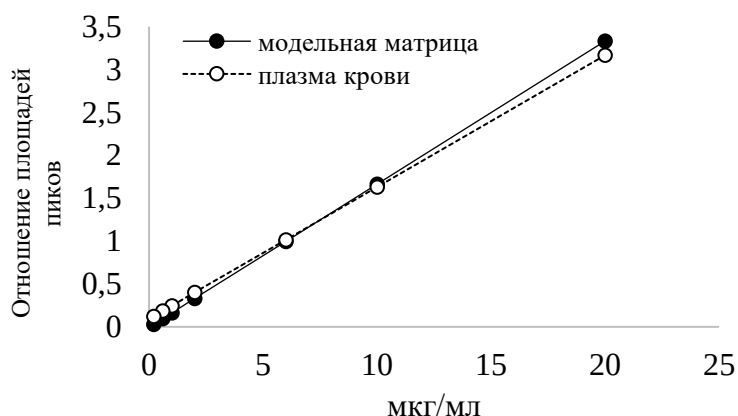


Рисунок 9 – Полученные усредненные уравнения регрессии для модельной матрицы и для плазмы крови

Таблица 3 – Угол наклона калибровочных кривых, приготовленных на модельной матрице и на плазме

	Угол наклона калибровочных кривых	
	Модельная матрица	Плазма
	0,183	0,1608
	0,160	0,147
	0,157	0,153
Среднее	0,1668	0,1536
SD	0,0144	0,0069
P (t критерий Стьюдента)	0,226	

Правильность концентраций калибровочных растворов на модельной матрице, рассчитанных с помощью полученных уравнений регрессии, соответствовала необходимым требованиям (не более 20% для НПКО, не более 15% для остальных точек) (Таблица 4).

Таблица 4 – Отклонения концентраций сукцината в модельной матрице в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочные графики №1, 2, 3

Концентрация, номинальная, нг/мл	График 1		График 2		График 3		Норма, не более %
	Концентрация, рассчитанная, нг/мл	Правильность - E, %	Концентрация, рассчитанная, нг/мл	Правильность - E, %	Концентрация, рассчитанная, нг/мл	Правильность - E, %	
200,0	191,9	4,03	212,2	6,1	190,6	4,69	20
600,0	661,5	10,3	578,7	3,5	588,7	1,88	15
1000,0	1011,9	1,20	869,2	13,1	1111,1	11,11	15
2000,0	1946,5	2,68	2134,7	6,7	1862,5	6,87	15
6000,0	5871,0	2,15	6824,1	13,7	6709,8	11,83	15
10000,0	9363,9	6,36	8832,9	11,7	8765,0	12,35	15
20000,0	20753,1	3,77	20348,2	1,7	20572,3	2,86	15

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности в образцы модельной матрицы вносили рабочие растворы сукцината и хлорамфеникола. Целевые концентрации сукцината довели до уровней 200, 600, 10000 и 16000 нг/мл, а концентрация хлорамфеникола в тех же образцах составляла 10 нг/мл. Исследование проводили в трех отдельных сериях (циклах). В каждой серии анализировали по 5 проб для каждого из четырех уровней содержания сукцината. Далее для всех зафиксированных значений концентраций вычисляли два параметра: относительное стандартное отклонение (RSD, или CV), характеризующее прецизионность, и относительную ошибку (E), отражающую правильность методики. Оценку прецизионности и правильности выполняли внутри и между аналитическими сериями. Полученные результаты представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Внутрицикловая и межцикловая правильность и прецизионность методики количественного определения сукцината в модельной матрице

Вид	Концентрация номинальная (нг/мл)	Среднее значение концентрации (нг/мл)	SD	RSD, %	E, %
Внутрицикловая	200	217,5	13,25	6,09	8,75
	600	605,9	41,06	6,78	0,98
	10000	8789,24	356,91	4,06	12,11
	16000	14423,4	612,66	4,25	9,85
Межцикловая	200	218,3	18,61	8,53	9,16
	600	619,26	57,23	9,24	3,21
	10000	9598,49	826,37	8,61	4,02
	16000	15498,1	1410,77	9,10	3,14

Внутри одной аналитической серии (повторности) использовали данные, полученные в ходе первой последовательности (по 5 измерений для каждого уровня контроля качества). Межсерийную вариабельность оценивали по объединенным результатам трех последовательностей (№1, №2 и №3), что соответствовало 15 измерениям на каждый уровень контроля качества.

Рассчитанные показатели RSD (CV) и относительной ошибки E укладывались в допустимые пределы: не выше 20% для точки на уровне НПКО и не более 15% для всех остальных концентраций.

Стабильность

В ходе работы оценивали стабильность сукцината и внутреннего стандарта – хлорамфеникола в составе рабочих растворов, сукцината в биологической матрице при хранении, трехкратном цикле заморозки-разморозки, а также после пробоподготовки. Образцы считали стабильными при изменении концентрации после хранения не более чем на 15%.

Стабильность стандартных растворов не анализировали, поскольку в ходе анализа использовались или разведенные рабочие растворы, или рабочие растворы разводились заново из навески стандартного образца Мексидола и хлорамфеникола (внутреннего стандарта).

Для проверки стабильности рабочих растворов сукцината их разводили модельной матрицей до конечных уровней 600 и 16 000 нг/мл (уровней нижнего и верхнего контролей качества), после чего выполняли хроматографический анализ. Данное разведение впоследствии учитывали при пересчете концентраций (Таблица 6). Сравнивали площади хроматографических пиков сукцината и хлорамфеникола в свежеприготовленных образцах и после хранения при минус - 80 °С в течение 123 суток. Результаты подтвердили, что оба рабочих раствора сохраняют устойчивость при указанных условиях хранения (% изменения площади хроматографических пиков аналита и внутреннего стандарта был <15%).

Таблица 6 – Стабильность рабочих растворов сукцината и хлорамфеникола (площади пиков)

	Сукцинат				Хлорамфеникол			
	600 нг/мл		16000 нг/мл		600 нг/мл		16000 нг/мл	
	До	После	До	После	До	После	До	После
	3253,0	4547,0	148689	142460	6311	6589	5571	6445
	4245,0	3828,0	138348	161362	6340	6502	5959	6261
	3599,0	4364,0	155178	146835	5724	6218	6247	6627
Среднее	3699,0	4246,33	147405,00	150219,00	6125,00	6436,33	5925,67	6444,33
Стандартное отклонение	503,5	373,66	8488,15	9894,95	347,58	194,02	339,23	183,00
%RSD	13,6	8,80	5,76	6,59	5,67	3,01	5,72	2,84
%Изменения		14,80		1,91		5,08		8,75
Соответствие		+		+		+		+

Оценку долгосрочной стабильности сукцината в замороженной плазме крови проводили на образцах, соответствующих по составу нижнему и верхнему уровням контроля качества. Часть проб проанализировали сразу после приготовления, остальные – после 97 дней хранения при температуре -80°C (Таблица 7). Полученные данные (снижение концентрации на 2,27% для нижнего уровня контроля качества и на 4,82% – для верхнего уровня) свидетельствуют о том, что сукцинат стабилен в составе плазмы крови при хранении в замороженном состоянии при -80°C в течение 97 дней.

Для оценки краткосрочной стабильности сукцината анализировали нижний и верхний уровень контроля качества. Половину проб анализировали сразу после приготовления, а остальные – после хранения в лотке автосемплера при $+6^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов. Полученные данные (повышение концентрации на 6,66% для нижнего уровня контроля качества и снижение концентрации на 3,14% для верхнего уровня) свидетельствуют о том, что сукцинат стабилен после пробоподготовки в лотке автосемплера в течение 24 часов при $+6^{\circ}\text{C}$ (Таблица 7).

Для оценки стабильности сукцината в составе плазмы крови при трехкратном цикле заморозки-разморозки при -80°C готовили пробы на уровне нижнего и верхнего контроля качества. Половину проб анализировали сразу после приготовления, а остальные после трехкратного цикла заморозки-разморозки. Полученные данные (повышение концентрации на 7,31% для нижнего уровня контроля качества и снижение концентрации на 7,66% для верхнего уровня) свидетельствуют о том, что сукцинат стабилен в составе плазмы крови при трехкратном цикле заморозки-разморозки при -80°C (Таблица 7).

Таким образом, доказана стабильность аналита и внутреннего стандарта в течение времени, превышающего время хранения, пробоподготовки и анализа образцов.

Таблица 7 – Стабильность сукцината в плазме крови

	Стабильность в замороженном состоянии при -80 ⁰ С в течение 97 дней				Краткосрочная стабильность в автосемплере				Стабильность в плазме крови при заморозке-разморозке			
	600 нг/мл		16000 нг/мл		600 нг/мл		16000 нг/мл		600 нг/мл		16000 нг/мл	
	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После
	1311,3	1268,5	18512,1	16336,9	1182,0	1294,9	15557,7	14330,4	971,2	1087,9	16830,9	15340,2
	1306,3	1244,5	16910,3	15625,2	1233,9	1297,1	15105,9	14613,9	983,7	1115,4	17355,9	16141,2
	1294,72	1310,5	16015,4	16997,9	1239,2	1306,6	14333,2	14640,9	1127,6	1104,4	16846,9	15644,3
Среднее	1304,1	1274,5	17145,9	16320,0	1218,4	1299,5	14998,9	14528,5	1027,5	1102,6	17011,2	15708,6
Стандартное отклонение	8,52	33,41	1264,9	686,5	31,6	6,20	619,2	172,0	86,91	13,79	298,54	404,36
%RSD	0,65	2,62	7,38	4,21	2,59	0,48	4,13	1,18	8,46	1,25	1,75	2,57
%Изменения		-2,27		-4,82		6,66		-3,14		7,31		-7,66
Соответствие		+		+		+		+		+		+

Перенос пробы

В ходе последовательного анализа (сначала измеряли образец с концентрацией сукцината 20 000 нг/мл, затем – холостую пробу модельной матрицы) было установлено, что на хроматограмме холостого образца либо отсутствовали пики, либо детектировались незначительные (отклик детектора при времени удерживания сукцината составлял менее 20% отклика в образце НПКО) пики, соответствующие по времени удерживания пикам сукцината. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии переноса пробы. Соответствующие хроматограммы приведены на Рисунках 10-11.

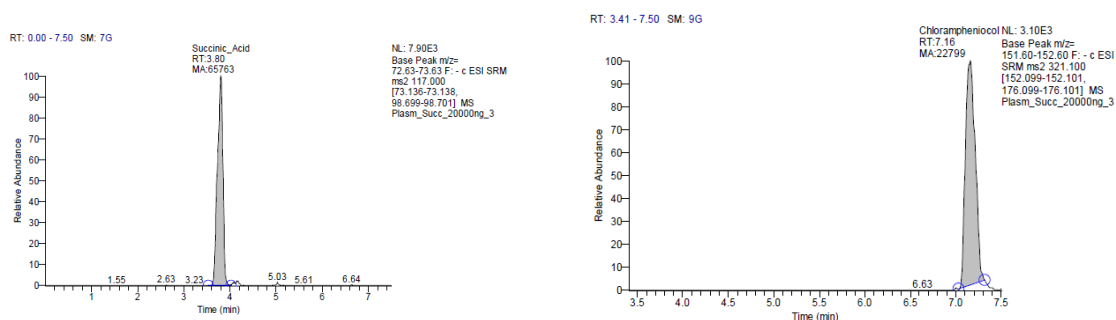


Рисунок 10 – Хроматограмма образца плазмы крови с прибавлением сукцината до концентрации 20 000 нг/мл и внутреннего стандарта хлорамфеникола до концентрации 10 нг/мл (цикл 2)

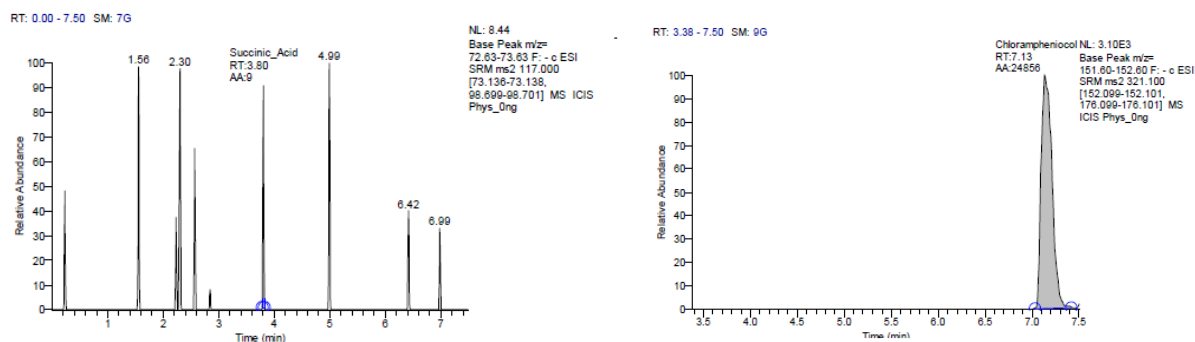


Рисунок 11 – Хроматограмма образца холостой модельной матрицы с прибавлением внутреннего стандарта хлорамфеникола до концентрации 10 нг/мл после анализа пробы с сукцинатом с концентрацией 20 000 нг/мл (цикл 2)

Матричный эффект

Под матричным эффектом понимали изменение регистрируемого масс-спектрометром отклика аналита под влиянием компонентов образца по сравнению с откликом того же количества аналита в растворе без матрицы. Матрица, в свою очередь, это всё, что поступает на анализ вместе с определяемым веществом: компоненты исходного биологического или иного образца и примеси, оставшиеся после пробоподготовки. Так как при оценке матричного эффекта важно было оценить именно влияние компонентов плазмы, то для оценки матричного эффекта в настоящем исследовании использовали образцы холостой плазмы крови, взятые у шести различных животных, а не модельную матрицу.

В каждой пробе измеряли площадь хроматографического пика, соответствующего эндогенному сукцинату. Далее образцы подвергали осаждению метанолом в объемном отношении 3 части растворителя на 1 часть плазмы. В полученные экстракты вносили рабочие растворы сукцината (для создания концентраций, соответствующих нижнему и верхнему уровню контроля качества) и внутренний стандарт, после чего повторно измеряли площади пиков. Параллельно те же самые контроли качества (нижний и верхний) и внутренний стандарт готовили на физиологическом растворе и также анализировали хроматографически. Матричный эффект вычисляли для каждого уровня контроля качества и для внутреннего стандарта по формуле: (площадь пика в экстракте плазмы минус площадь эндогенного пика) / площадь пика на физрастворе.

Также рассчитывали нормализованный эффект матрицы по внутреннему стандарту (как частное от деления эффекта матрицы анализируемого вещества на эффект матрицы внутреннего стандарта). Относительное стандартное отклонение матричного эффекта сукцината, хлорамфеникола и нормализованного матричного эффекта сукцината, рассчитанные для 6 биологических образцов, не превышали 15%, что соответствует принятой норме (Таблица 8).

Таблица 8 – Эффект матрицы для сукцината в плазме крови

Концентрация		Холостая плазма крови	Сукцинат					Хлорамфеникол		
		Площадь пика эндогенного сукцината	Площадь пика на плазме	Площадь пика экзогенного сукцината (дельта)	Площадь пика на физрастворе	Матричный эффект	Нормализованный матричный эффект	Площадь пика на плазме	Площадь пика на физрастворе	Матричный эффект
600 нг/мл	M	6498,5	9102,1	2603,59	2477,1	1,05	0,88	29272,8	24469,5	1,20
	SD	674,4	559,6	357,42	165,9	0,14	0,13	640,3	2366,8	0,03
	RSD, %	10,38	6,15	13,73	6,70	13,73	14,80	2,19	9,67	2,19
1600 нг/мл	M	5318,5	71595,3	66276,8	66858,6	0,99	0,86	29033,7	25284,3	1,15
	SD	408,9	1939,8	1917,2	4386,7	0,03	0,01	801,32	859,2	0,03
	RSD, %	7,69	2,71	2,89	6,56	2,89	1,42	2,76	3,40	2,76

Извлечение

Под извлечением (эффективность экстракции, *extraction recovery*) понимали долю определяемого вещества, которая сохраняется и попадает в конечный раствор для анализа после всех этапов пробоподготовки. Иными словами, показатель отвечает на вопрос: какая часть аналита, находившегося в исходном образце, прошла через осаждение белков, жидкостную экстракцию, переносы, выпаривание и восстановление раствора. Потери на любом из этих этапов могут уменьшить извлечение.

В настоящей работе использовали холостую плазму от шести различных животных (те же образцы, что использовали для оценки матричного эффекта). После экстракции в образцы плазмы добавляли рабочие растворы сукцината (для достижения уровней нижнего и верхнего контроля качества) и внутренний стандарт. Параллельно готовили растворы сукцината на тех же образцах холостой плазмы крови с такими же концентрациями и подвергали стандартной пробоподготовке раствором метанола с внутренним стандартом.

Для каждой концентрации сукцината и для внутреннего стандарта извлечение вычисляли по формуле: (площадь пика веществ после стандартной пробоподготовки образцов в плазме крови) / (площадь пика веществ при разведении на экстракте плазмы крови (эти же значения использовались для расчета матричного эффекта)).

Также рассчитывали нормализованное по внутреннему стандарту извлечение (как частное от деления извлечения анализируемого вещества на извлечение внутреннего стандарта). Относительное стандартное отклонение (RSD) для извлечения сукцината, извлечения хлорамфеникола и нормализованного извлечения сукцината не превышало 15%, что соответствует предъявляемым требованиям (Таблица 9).

Таблица 9 – Степень извлечения для сукцината в плазме крови

Концентрация		Сукцинат				Хлорамфеникол		
		Площадь пика контроля качества	Площадь пика в матрице	% извлечения	Нормализованный % извлечения	Площадь пика контроля качества	Площадь пика в матрице	% извлечения
600 нг/мл	Среднее	8775,67	9102,09	0,96	0,97	29099,50	29272,77	0,99
	SD	226,51	559,56	0,02	0,02	796,63	640,30	0,03
	<i>RSD</i> , %	2,58	6,15	2,58	1,87	2,74	2,19	2,74
1600 нг/мл	Среднее	71579,36	71595,30	1,00	1,03	28197,52	29033,72	0,97
	SD	1164,18	1939,81	0,02	0,03	651,58	801,32	0,02
	<i>RSD</i> , %	1,63	2,71	1,63	3,00	2,31	2,76	2,31

Эффект разбавления

Готовили образец холостой плазмы крови с добавлением сукцината до концентрации 2 000 000 и 200 000 нг/мл и разводили его той же холостой плазмой крови в 100 или 10 раз соответственно. Результаты представлены в Таблице 10. Правильность при анализе образца с концентрацией 2 000 000 нг/мл составила 4,40%, образца 200 000 нг/мл – 9,92%. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии влияния разбавления на анализ количества сукцината.

Таблица 10 – Влияние разбавления в 100 и 10 раз на анализ сукцината в плазме крови

	Полученные концентрации	
	Разведение в 100 раз	Разведение в 10 раз
	19359,55	22468,33
	18734,61	22381,94
	19717,41	23335,56
	19898,89	19523,72
	22614,84	24033,25
	24955,19	20157,06
Среднее	20880,08	21983,31
Стандартное отклонение	2401,90	1778,19
%RSD	11,50	8,09
%E	4,40	9,92
Соответствие	Соответствует	Соответствует

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об успешной валидации методики количественного определения сукцината в плазме крови крыс.

3.2. Частичная валидация методики количественного определения сукцината в гомогенате органов крыс, транспортной среде и лизате клеток НерG2

В цитоплазматической фракции гомогенатов всех тестируемых органов, а также в лизате клеток НерG2 фиксировались хроматографические пики, соответствующие пикам эндогенного сукцината. В то же время, в митохондриальной фракции всех изучаемых органов и транспортной среде для экспериментов с клетками линии Сасо-2 практически отсутствовал аналитический отклик от эндогенного сукцината (Рисунок 12).

Учитывая наличие сукцината в используемых биологических матрицах, калибровочные образцы и образцы контролей качества разводили на изотоническом фосфатном буфере с рН 7,4 (бычий сывороточный альбумин в образцы не добавляли из-за низкого содержания белка в биологических образцах).

Аналитический диапазон методики количественного определения сукцината во фракциях органов, в транспортной среде и лизате клеток составил 20,0 нг/мл – 5000,0 нг/мл.

Нижний предел количественного определения

Величину нижнего предела количественного определения (НПКО) для разработанной методики устанавливали, опираясь на результаты изучения линейности, правильности и прецизионности. В качестве НПКО принимали наименьшую концентрацию сукцината, которая попадает в область линейного отклика детектора и позволяет надежно количественно определять аналит с правильностью и прецизионностью, не превышающей 20%. Установленное значение НПКО для сукцината составило 20 нг/мл. Отношение сигнал : шум при этом было не менее 1 к 5. Предел детектирования составил 10 нг/мл, отношение сигнал шум было не менее 1 к 3.

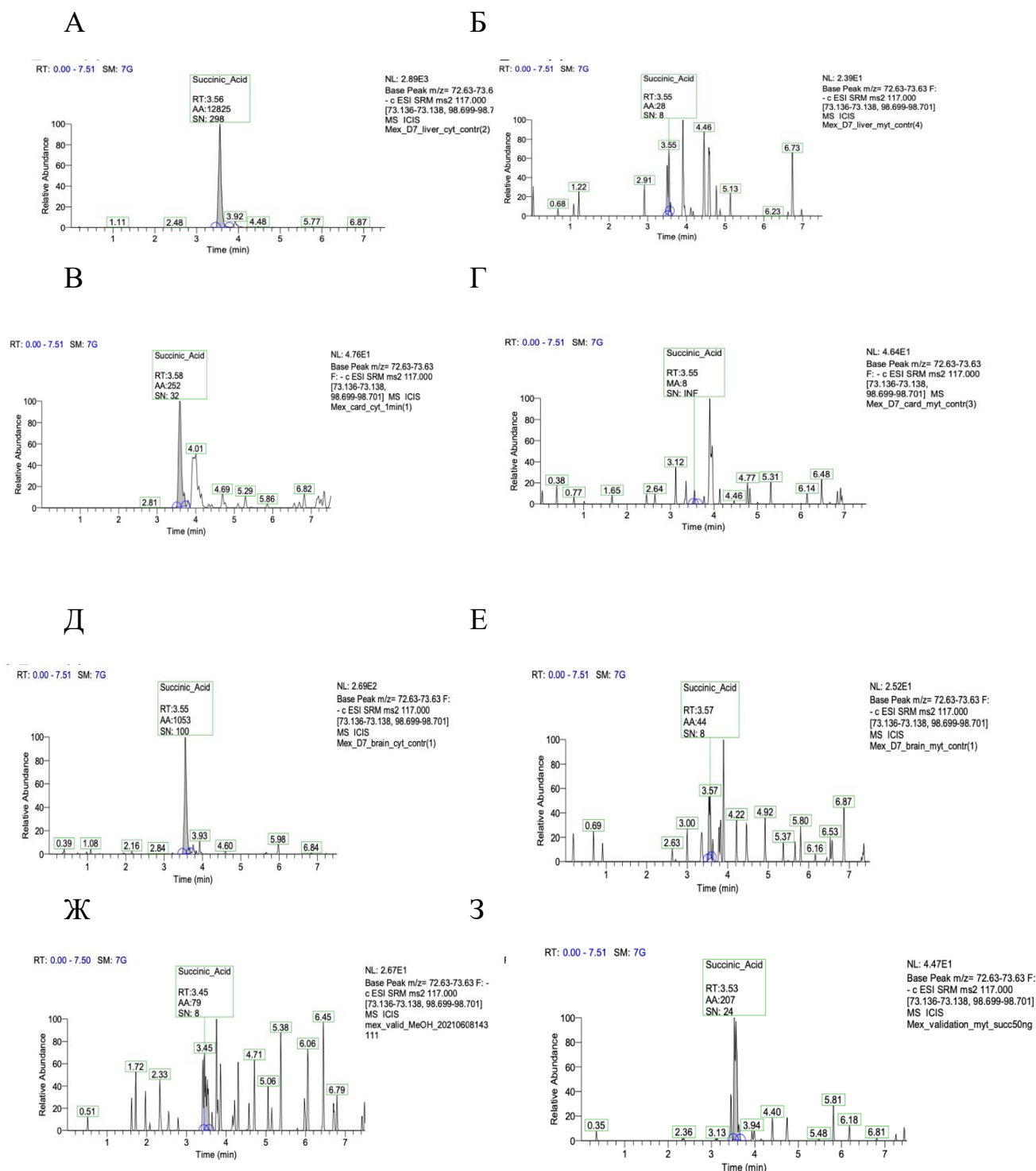


Рисунок 12 – Типовые хроматограммы матриц

Примечание – А – Хроматограмма образца цитоплазматической фракции печени; Б – Хроматограмма образца митохондриальной фракции печени; В – Хроматограмма образца цитоплазматической фракции сердца; Г – Хроматограмма образца митохондриальной фракции сердца; Д – Хроматограмма образца цитоплазматической фракции коры головного мозга; Е – Хроматограмма образца митохондриальной фракции коры головного мозга; Ж – Хроматограмма образца транспортной среды; З – Хроматограмма образца лизата клеток HepG2.

Калибровочная кривая

Калибровочные образцы сукцината с концентрациями 20, 50, 100, 500, 1000 и 5000 нг/мл разводили на фосфатном буфере. Пробоподготовку осуществляли добавлением раствора метанола с содержанием в качестве внутреннего стандарта хлорамфеникола («Dr Ehrenstorfer», Германия) в концентрации 10 нг/мл, из соотношения 600 мкл на 200 мкл образца.

Используя полученные значения, строили калибровочные графики, где по оси Y было отношение площади пика сукцината к площади пика хлорамфеникола, а по оси X концентрация сукцината. Графики приведены на Рисунке 13.

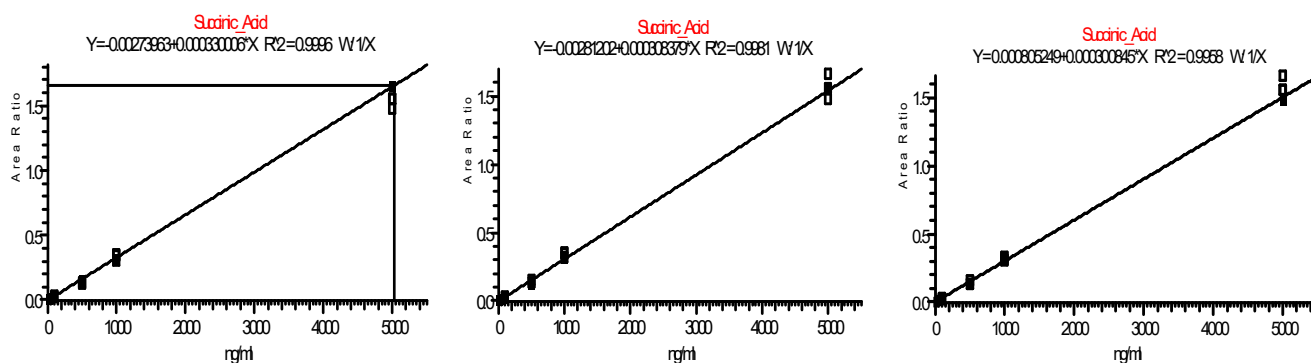


Рисунок 13 – Калибровочные графики зависимости отношения площади пика сукцината к площади пика хлорамфеникола от концентрации сукцината в фосфатном буфере

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в Таблице 11.

Правильность концентраций калибровочных растворов на модельной матрице соответствовала необходимым требованиям (не более 20% для НПКО, не более 15% для остальных точек).

Таблица 11 – Отклонения концентраций сукцината в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочные графики №1, 2, 3

Концентрация, номинальная, нг/мл	График 1		График 2		График 3		Норматив, не более %
	Концентрация, рассчитанная, нг/мл	Правильность - E , %	Концентрация, рассчитанная, нг/мл	Правильность - E , %	Концентрация, рассчитанная, нг/мл	Правильность - E , %	
20	17,97	10,15	21,69	8,47	18,29	8,52	20
50	55,39	10,79	55,56	11,13	54,06	8,11	15
100	104,29	4,29	92,05	7,95	98,86	1,14	15
500	484,78	3,04	430,02	14,00	447,68	10,46	15
1000	974,53	2,55	1011,64	1,16	1137,38	13,74	15
5000	5033,04	0,66	5059,02	1,18	4913,73	1,73	15

Правильность и прецизионность

Эксперимент выполняли на модельной матрице (фосфатном буфере), в которую вносили рабочие растворы сукцината и хлорамфеникола. Целевые концентрации сукцината довели до 20, 60, 2000 и 4000 нг/мл, а концентрация хлорамфеникола в тех же образцах составляла 10 нг/мл. Исследование проводили в трех отдельных сериях (циклах). В каждой серии анализировали по 5 проб для каждого из четырех уровней содержания сукцината. Далее для всех зафиксированных значений концентраций вычисляли два параметра: относительное стандартное отклонение (RSD, или CV), характеризующее прецизионность, и относительную ошибку (E), отражающую правильность методики. Результаты расчетов представлены в Таблице 12.

Оценку прецизионности (в виде относительного стандартного отклонения, RSD или CV) и правильности (как относительной погрешности E) выполняли

внутри и между аналитическими сериями.

Таблица 12 – Внутрицикловая и межцикловая правильность и прецизионность методики количественного определения сукцината в модельной матрице

Вид	Концентрация номинальная (нг/мл)	Среднее значение концентрации (нг/мл)	SD	RSD, %	E, %
Внутрицикловая	20	23,21	1,01	4,37	16,05
	60	65,07	4,48	6,88	8,45
	2000	1775,80	68,21	3,84	11,21
	4000	3718,66	132,95	3,58	7,03
Межцикловая	20	23,09	0,68	2,96	15,47
	60	64,29	2,41	3,75	-7,16
	2000	1853,92	83,18	4,49	7,30
	4000	4067,17	360,88	8,87	-1,68

Внутри одной аналитической серии (повторности) использовали данные, полученные в ходе первой последовательности (по 5 измерений для каждого уровня контроля качества). Межсерийную вариабельность оценивали по объединенным результатам трех последовательностей (№1, №2 и №3), что соответствовало 15 измерениям на каждый уровень контроля качества. Рассчитанные показатели RSD (CV) и относительной ошибки E укладывались в допустимые пределы: не выше 20% для точки на уровне НПКО и не более 15% для всех остальных концентраций.

Стабильность

Стабильность сукцината в модельной матрице (фосфатном буфере) анализировали при хранении в течение 97 дней при -80 °С. Для этого готовили разведения сукцината, соответствующие концентрациям образцов контроля качества. Исследовали по 3 независимых образца для каждой концентрации. Результаты представлены в Таблице 13.

Таблица 13 – Стабильность сукцината в модельной матрице при -80°C

	Стабильность в замороженном состоянии при -80°C в течение 97 дней			
	60 нг/мл		4000 нг/мл	
	До	После	До	После
	68,06	63,56	3871,93	3741,93
	67,23	62,11	3649,62	3902,31
	59,92	57,65	3634,43	3802,63
Среднее	65,07	61,11	3718,66	3815,62
Стандартное отклонение	4,48	3,08	132,95	80,98
%RSD	6,88	5,04	3,58	2,12
%Изменения		6,61		3,36
Соответствие		+		+

Остальные виды стабильности не анализировались поскольку они были доказаны в рамках полной валидации аналитической методики количественного определения сукцината в плазме крови.

Матричный эффект

Для оценки матричного эффекта использовали образцы холостой митохондриальной фракции смеси гомогенатов органов крыс (коры больших полушарий, миокарда и печени в соотношении 1:1:1), полученных от 6 разных источников. Выбор данной модельной матрицы обусловлен тем, что в митохондриальной фракции было выше содержания белка, чем в лизате клеток НерG2, и при этом не детектировался эндогенный сукцинат в отличие от цитоплазматической фракции. Образцы смеси митохондриальных фракций подвергали пробоподготовке, осаждением белков метанолом в объемном отношении 3 части растворителя на 1 часть митохондриальной фракции. В полученные экстракты вносили рабочие растворы сукцината (для создания концентраций, соответствующих нижнему и верхнему уровню контроля качества) и внутренний стандарт, после чего повторно измеряли площади пиков (Таблица 14).

Таблица 14 – Эффект матрицы для сукцината в митохондриальной фракции гомогенатов органов крыс

Концентрация		Сукцинат				Хлорамфеникол		
		Площадь пика на гомогенате	Площадь пика на физрастворе	Матричный эффект	Нормализованный матричный эффект	Площадь пика на гомогенате	Площадь пика на физрастворе	Матричный эффект
60 нг/мл	M	252,83	248,00	1,02	1,01	11808,50	11620,50	1,02
	SD	10,59	10,88	0,04	0,08	623,44	420,50	0,05
	RSD, %	4,19	4,39	4,19	8,30	5,28	3,62	5,28
4000 нг/мл	M	14786,83	14267,17	1,04	0,98	13077,17	12312,17	1,06
	SD	720,04	384,52	0,05	0,07	697,85	410,40	0,06
	RSD, %	4,87	2,70	4,87	7,50	5,34	3,33	5,34

Параллельно те же самые контроли качества (нижний и верхний) и внутренний стандарт готовили на физиологическом растворе и также анализировали хроматографически. Матричный эффект вычисляли для каждого уровня контроля качества и для внутреннего стандарта по формуле: площадь пика в экстракте митохондриальных фракций органов / площадь пика на физрастворе. Также рассчитывали нормализованный эффект матрицы по внутреннему стандарту (как частное от деления эффекта матрицы анализируемого вещества на эффект матрицы внутреннего стандарта). Относительное стандартное отклонение матричного эффекта сукцината, хлорамфеникола и нормализованного матричного эффекта сукцината, рассчитанные для 6 биологических образцов, не превышали 15%, что соответствует норме (Таблица 14).

Извлечение

В работе использовали образцы холостой митохондриальной фракции смеси гомогенатов органов крыс, полученных от 6 разных источников, которые использовались для оценки матричного эффекта. После экстракции в образцы митохондриальной фракции добавляли рабочие растворы сукцината (для достижения уровней нижнего и верхнего контроля качества) и внутренний стандарт. Параллельно готовили растворы сукцината в той же митохондриальной фракции гомогенатов органов крыс с такими же концентрациями и подвергали стандартной пробоподготовке раствором метанола с внутренним стандартом. Для каждой концентрации сукцината и для внутреннего стандарта извлечение вычисляли по формуле: (площадь пика веществ после стандартной пробоподготовки образцов в митохондриальной фракции органов) / (площадь пика веществ при разведении на экстракте митохондриальной фракции органов (эти же значения использовались для расчета матричного эффекта)). Также рассчитывали нормализованное по внутреннему стандарту извлечение (как частное от деления извлечения анализируемого вещества на извлечение внутреннего стандарта) (Таблица 15).

Таблица 15 – Степень извлечения для сукцината в митохондриальной фракции гомогенатов органов крыс

Концентрация		Сукцинат				Хлорамфеникол		
		Площадь пика контроля качества	Площадь пика в матрице	% извлечения	Нормализованный % извлечения	Площадь пика контроля качества	Площадь пика в матрице	% извлечения
60 нг/мл	Среднее	222,17	252,83	0,88	0,82	12589,33	11808,50	1,07
	SD	16,33	10,59	0,03	0,03	349,92	623,44	0,06
	<i>RSD</i> , %	7,35	4,19	3,79	4,01	2,78	5,28	6,05
4000 нг/мл	Среднее	13611,50	14786,83	0,92	0,95	12675,50	13077,17	0,97
	SD	893,98	720,04	0,05	0,06	745,73	697,85	0,05
	<i>RSD</i> , %	6,57	4,87	5,88	5,92	5,88	5,34	5,63

Относительное стандартное отклонение (RSD) для извлечения сукцината, извлечения хлорамфеникола и нормализованного извлечения сукцината не превышало 15%, что соответствует предъявляемым требованиям (Таблица 15).

С помощью данной методики с использованием фосфатного буфера в качестве модельной матрицы и аналитического диапазона 20 – 5000 нг/мл также оценивали концентрацию сукцината в транспортной среде при выполнении экспериментов на клетках линии Caco-2 и в лизате клеток HepG2.

3.3. Проникновение сукцината, входящего в состав Мексидола, через монослой клеток линии Caco-2

Проникновение сукцината, входящего в состав Мексидола, через клеточный монослой изучено в опытах *in vitro* на клетках линии Caco-2 в специальных трансвелл-системах.

Мексидол добавляли в камеру-донор (апикальную или базолатеральную) в концентрации 250 мкМ. Через 1, 2 и 3 часа из камеры-реципиента (базолатеральной или апикальной) забирали образцы и определяли концентрацию сукцината. На основе полученных результатов рассчитывали коэффициенты кажущей проницаемости $P_{app} \text{ } b-a$ и $P_{app} \text{ } a-b$. Коэффициент кажущейся проницаемости сукцината $P_{app} \text{ } b-a$ составил $13,4 \pm 1,9 \times 10^{-6}$ см/сек, $P_{app} \text{ } a-b$ – $10,5 \pm 0,9 \times 10^{-6}$ см/сек (Таблица 16). Отношение $P_{app} \text{ } b-a/P_{app} \text{ } a-b$ равнялось $1,28 \pm 0,07$, что свидетельствует об отсутствии выраженной асимметрии транспорта сукцината через монослой клеток Caco-2.

При изучении транспорта фексофенадина в концентрации 300 мкМ коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ } b-a$ составил $2,91 \pm 3,79 \times 10^{-6}$ см/сек, $P_{app} \text{ } a-b$ – $0,68 \pm 0,19 \times 10^{-6}$ см/сек, а отношение $P_{app} \text{ } b-a/P_{app} \text{ } a-b$ – $4,51 \pm 1,29$ (Таблица 16).

При тестировании транспорта метотрексата в концентрации 50 мкМ коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ } b-a$ составил $0,13 \pm 0,05 \times 10^{-6}$, $P_{app} \text{ } a-b$ – $0,33 \pm 0,01 \times 10^{-6}$, а отношение $P_{app} \text{ } b-a/P_{app} \text{ } a-b$ – $0,42 \pm 0,14$ (Таблица 16).

Таблица 16 – Транспорт сукцината, входящего в состав Мексидола, фексофенадина и метотрексата через монослой клеток линии Caco-2 ($M \pm SD$)

Исследуемый показатель	Мексидол 250 мкМ	Фексофенадин 300 мкМ	Метотрексат 50 мкМ
$P_{app} \text{ } b-a, \times 10^{-6} \text{ см/с}$	$13,4 \pm 1,9$	$2,91 \pm 3,79^{**}$	$0,13 \pm 0,05^{**}$
$P_{app} \text{ } a-b, \times 10^{-6} \text{ см/с}$	$10,5 \pm 0,9$	$0,68 \pm 0,19^{**}$	$0,33 \pm 0,01^{**}$
$P_{app} \text{ } b-a / P_{app} \text{ } a-b$	$1,28 \pm 0,07$	$4,51 \pm 1,29^{*}$	$0,42 \pm 0,14^{**}$
Примечание – * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями группы Мексидола			

Оба коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ } b-a$ и $P_{app} \text{ } a-b$ фексофенадина и метотрексата были статистически значимо ниже значений аналогичных показателей сукцината ($p < 0,01$), что свидетельствует о том, что скорость проникновения сукцината значительно выше, чем скорость проникновения фексофенадина и метотрексата через монослой клеток, то есть сукцинат, входящий в состав Мексидола, будет быстро абсорбироваться в желудочно-кишечном тракте.

Отношение коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ } b-a / P_{app} \text{ } a-b$ фексофенадина было больше двух, что свидетельствует об активном транспорте вещества в направлении из базолатеральной камеры в апикальную и соответствует транспорту из клеток в просвет кишечника, а отношение коэффициентов кажущейся проницаемости для метотрексата было меньше 0,5, что характеризует активный транспорт метотрексата в направлении из апикальной камеры в базолатеральную, то есть из просвета кишечника внутрь клеток.

В то же время отношение $P_{app} \text{ } b-a / P_{app} \text{ } a-b$ сукцината было около «1», что свидетельствует об отсутствии выраженной асимметрии транспорта сукцината через монослой клеток Caco-2, то есть об отсутствии активного транспорта данного вещества, и дает возможность предположить, что основным механизмом транспорта сукцината, входящего в состав Мексидола, является пассивная диффузия.

3.4. Проникновение сукцината, входящего в состав Мексидола, внутрь клеток НерG2

Добавление Мексидола к монослою клеток НерG2 в концентрации 1 и 10 мкМ (Таблица 17) достоверно не влияло на концентрацию янтарной кислоты во все сроки инкубации (15, 30 и 60 минут).

При использовании Мексидола в концентрации 100 мкМ отмечалось повышение уровня янтарной кислоты через 30 минут после добавления тестируемого препарата на 214,8% ($p < 0,05$) соответственно. К 60 минутам уровень янтарной кислоты снижался до показателей интактных клеток.

Таблица 17 – Влияние Мексидола на концентрацию сукцината в лизате клеток НерG2 (нг/мл, $M \pm SD$)

Концентрация Мексидола	норма	5 мин	15 мин	30 мин	60 мин
1 мкМ	23,1± 2,66	23,14±2,20	29,00±6,82	34,98±8,96	23,76±4,74
10 мкМ		33,00±8,88	35,36±4,72	36,06±11,64	29,10±3,56
100 мкМ		37,02±22,28	42,68±11,90	72,72±38,72*	26,44±5,04
Примечание – * - $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями нормы					

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, при добавлении Мексидола к клеткам линии НерG2 сукцинат проникает внутрь клеток и быстро в них метаболизируется.

3.5. Фармакокинетика сукцината после внутривенного введения Мексидола крысам wistar в дозе 100 мг/кг массы

Концентрация эндогенного сукцината в плазме крови интактных животных составила $259,20 \pm 117,17$ нг/мл. После внутривенного введения Мексидола плазменная концентрация сукцината достигала максимального значения через 1

минуту, превышая показатели нормы в 917,9 раза ($p < 0,001$), затем быстро снижалась и к 90-й минуте была выше показателей интактных крыс всего в 2,2 раза ($p = 0,104$) (Рисунок 14).

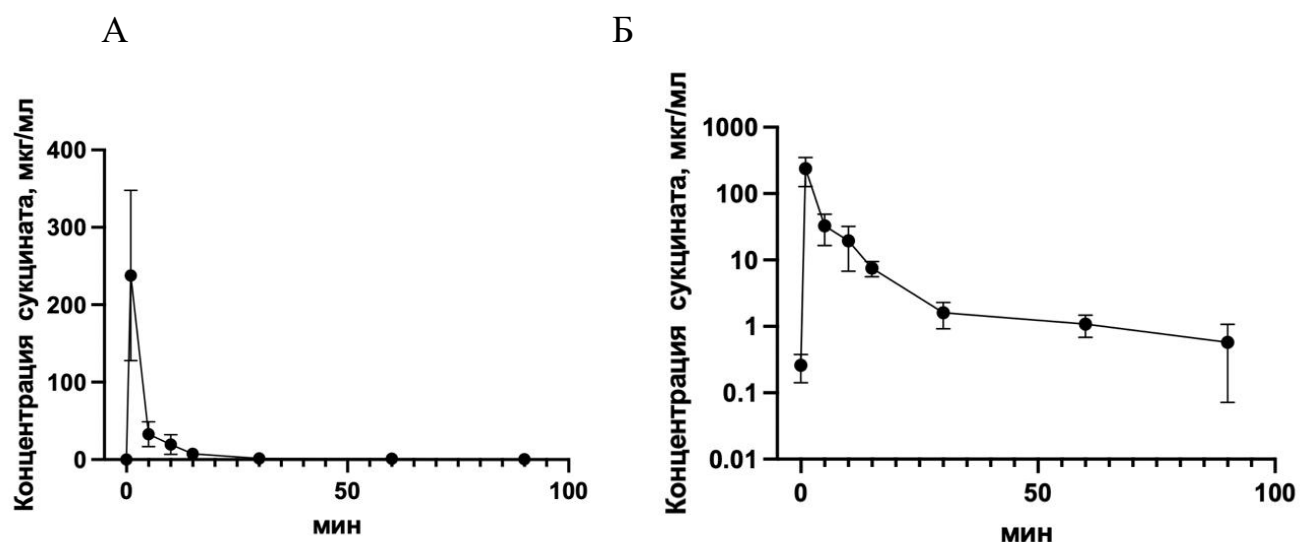


Рисунок 14 – Концентрация сукцината в плазме крови крыс после внутривенного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг (нг/мл)
Примечание – А – линейные координаты, Б – полулогарифмические координаты

Для расчёта фармакокинетических параметров сукцината использовались значения, полученные путём вычитания показателей уровня эндогенного сукцината из показателей концентрации сукцината после введения Мексидола [8]. Были получены следующие фармакокинетические параметры сукцината: $C_{\max}$ – $237,68 \pm 110,21$ мкг/мл, AUC_{0-t} – $845,06 \pm 342,27$ мкг/мл $\times$ мин, $AUC_{0-\infty}$ – $858,17 \pm 346,86$ мкг/мл $\times$ мин, K_{el} – $0,05 \pm 0,01$ мин $^{-1}$, $T_{1/2}$ – $13,19 \pm 2,07$ мин, Cl – $60,73 \pm 24,06$ мл/мин, MRT – $8,36 \pm 1,32$ мин. Эти данные свидетельствуют о том, что сукцинат после внутривенного введения Мексидола быстро выводился из организма крыс, при этом он равномерно распределялся по организму, проникая в органы и ткани, и не депонировался: объём распределения составил $1188,92 \pm 620,44$ мл/кг, если принять за среднюю массу крысы 200 г, то 237,784 мл (т.е. примерно равен объёму животного).

На следующем этапе исследования была оценена камерность

фармакокинетики сукцината. Убывающая моноэкспоненциальная зависимость использовалась для математического описания однокамерной фармакокинетической модели, а убывающая биэкспоненциальная зависимость – для описания простейшей двухкамерной фармакокинетической модели. Уравнения моно- и биэкспоненциальных зависимостей можно представить в виде: $C_t = A \times \exp(-\alpha \times t)$ (1) и $C_t = A \times \exp(-\alpha \times t) + B \times \exp(-\beta \times t)$ (2), где C_t – концентрация фармакологического вещества в крови в момент времени t ; A , B , α и β – гибридные константы (макроконстанты) интегральных уравнений (1) и (2). В случае биэкспоненциальной зависимости (двухкамерная модель) первая экспонента (макроконстанты A и α) в основном отражает процесс распределения вещества между центральной и периферической камерами, а вторая экспонента (макроконстанты B и β) – процесс элиминации вещества из центральной камеры. При оценке камерности фармакокинетической модели сукцината после его однократного внутривенного введения установлено, что более точно концентрацию сукцината в плазме крови описывает двухкамерная фармакокинетическая модель. Были получены следующие основные параметры двухкамерной фармакокинетической модели: константа A – $9,85 \pm 0,66$; константа α – $0,16 \pm 0,17 \text{ мин}^{-1}$; константа B – $-0,05 \pm 0,01$; константа β – $0,10 \pm 0,12 \text{ мин}^{-1}$; K_{1-2} (константа перехода из центральной (1) в периферическую (2) камеру) – $0,15 \pm 0,10 \text{ мин}^{-1}$; K_{2-1} – $0,02 \pm 0,03 \text{ мин}^{-1}$; C_0 – $143,01 \pm 85,69 \text{ мкг/мл}$.

При изучении изменения уровня сукцината в цитоплазматических и митохондриальных фракциях коры больших полушарий, миокарда и печени крыс после внутривенного введения Мексидола были получены следующие результаты (Таблица 18).

Таблица 18 – Концентрация сукцината в цитоплазматической и митохондриальной фракциях исследуемых органов крыс после внутривенного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг (нг/мл; $M \pm SD$, Me (min; max))

Орган	Норма	Время после введения Мексидола					
		1 мин	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	60 мин
Миокард							
Цитоплазма	85,24±23,97	123,70±26,54	95,40±47,43	150,15±93,37*	85,58±35,33	73,66±29,07	84,37±33,18
Митохондрии	0,00 (0,00; 25,55)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 22,41)	142,84 (0,00; 254,19) *	25,95 (0,00; 73,29)	0,00 (0,00; 65,87)	0,00 (0,00; 42,48)
Мозг							
Цитоплазма	278,32±254,85	940,15±813,42*	522,62±156,44	921,51±768,34*	483,08±172,04	556,77±245,40	641,16±239,54
Митохондрии	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 21,78)	0,00 (0,00; 31,56)	23,76 (0,00; 38,12) p=0,05	0,00 (0,00; 45,88)	0,00 (0,00; 0,00)	22,48 (0,00; 30,43)
Печень							
Цитоплазма	996,09±515,10	1831,76±668,28	1326,04±571,03	2306,70±1030,26	1115,31±940,63	1932,16±1161,43	1891,12±1123,85
Митохондрии	0,00 (0,00; 32,09)	0,00 (0,00; 25,22)	32,54 (23,35; 70,67)	60,9 (0,00; 88,51) p=0,05	23,84 (0,00; 55,00)	33,52 (0,00; 58,70)	51,32 (00,00; 100,31)
Примечание – * – p <0,05 по сравнению с нормой							

В коре больших полушарий уровень сукцината увеличился в цитоплазматической фракции через 1 минуту на 237,8% ($p=0,021$) и через 10 минут на 231,1% ($p=0,025$), в митохондриальной – начинал детектироваться через 10 минут ($p=0,054$).

Внутривенное введение Мексидола приводило к повышению в миокарде концентрации сукцината в цитоплазматической фракции через 10 минут на 76,1% ($p=0,026$), а в митохондриальной фракции сукцинат начинал детектироваться через 10 минут ($p=0,034$) (Таблица 18).

В печени концентрация сукцината находилась на грани достоверного повышения в цитоплазматической фракции через 10 минут на 131,6% ($p=0,11$), в митохондриальной фракции детектировалась через 10 минут ($p=0,052$) после введения Мексидола.

При этом обращает на себя внимание разный уровень сукцината в разных органах. Минимальная концентрация сукцината отмечалась в миокарде, средняя в мозге, а максимальная отмечалась в печени.

Таким образом, в ходе настоящего исследования было установлено, что после однократного внутривенного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг массы сукцинат проникает в цитоплазматическую и митохондриальную фракции миокарда, коры больших полушарий головного мозга и печени. Однако повышение уровня сукцината носит кратковременный характер (отмечается в единичных фармакокинетических точках).

3.6. Фармакокинетика сукцината после внутрижелудочного введения Мексидола крысам wistar в дозе 100 мг/кг массы

Внутрижелудочное введение Мексидола в дозе 100 мг/кг приводило к повышению содержания сукцината в плазме крови крыс уже через 5 минут после введения, которое достигало максимального значения к 10 минутам, превосходя значения нормы в 5,14 раза ($p=0,018$) и снижалось к 30 минутам, достоверно не отличаясь от значений нормы ($p=0,34$).

Для расчета фармакокинетических параметров сукцината использовали значения, полученные путем вычитания показателей уровня эндогенного сукцината из показателей концентрации сукцината после введения Мексидола (Рисунок 15).

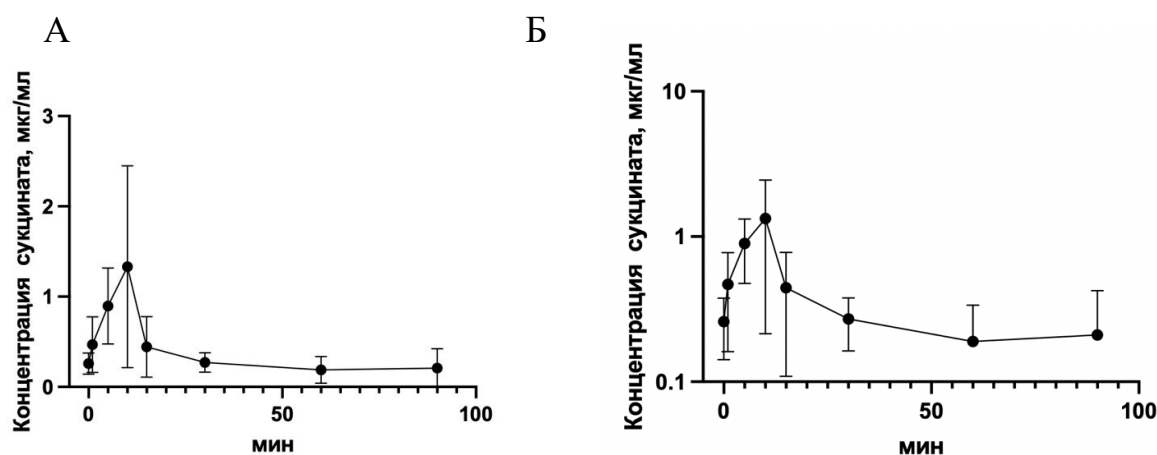


Рисунок 15 – Концентрация сукцината в плазме крови крыс после внутрижелудочного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг (нг/мл)
Примечание – А – линейные координаты, Б – полулогарифмические координаты

Были получены следующие фармакокинетические параметры сукцината: $C_{\max}$ $1,13 \pm 1,09$ мкг/мл, $T_{\max}$ 10,00 (5,00; 10,00) мин, AUC_{0-t} $12,09 \pm 6,89$ мкг/мл $\times$ мин, $AUC_{0-\infty}$ $15,68 \pm 9,71$ мкг/мл $\times$ мин, K_{el} $0,09 \pm 0,11$ мин $^{-1}$, $T_{1/2}$ $17,10 \pm 11,82$ мин, Cl/F $100,48 \pm 64,42$ л/мин, MRT $30,98 \pm 30,21$ мин. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сукцинат после внутрижелудочного введения Мексидола быстро всасывается, попадает в системный кровоток и также быстро элиминируется. Абсолютная биодоступность сукцината после внутрижелудочного введения Мексидола рассчитывалась как отношение AUC_{0-t} после внутрижелудочного введения к AUC_{0-t} после внутривенного введения и составила 1,43%.

Внутрижелудочное введение Мексидола достоверно не влияло на уровень сукцината в цитоплазматической и митохондриальной фракциях миокарда, коры больших полушарий головного мозга и печени крыс (Таблица 19). Отмечалась лишь тенденция к его повышению в митохондриальной фракции коры больших полушарий через 15 минут после введения и в митохондриальной фракции печени через 10 минут.

Таблица 19 – Концентрация сукцината в цитоплазматической и митохондриальной фракциях органов крыс после внутрижелудочного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг (нг/мл; $M \pm SD$, Me (min; max))

Исследуемый орган	Норма	Время после введения Мексидола					
		1 мин	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	60 мин
Миокард							
Цитоплазма	85,2±23,9	54,9±32,8	45,8±14,4	50,9±14,5	64,5±15,8	41,0±7,7	42,5±13,8
Митохондрии	0,0 (0,0; 25,5)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0; 23,2)	0,0 (0,0; 48,6)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Мозг							
Цитоплазма	302,41 (0,00; 665,78)	440,68 (111,58; 1267,58)	621,44 (328,82; 788,56)	388,38 (194,43; 723,91)	392,5 (228,0; 936,6)	572,81 (76,68; 1244,85)	452,7 (290,3; 1153,9)
Митохондрии	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0; 46,2)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 49,4)	85,5 (0,0; 1568,5)	67,4 (0,0; 79,4)	21,1 (0,0; 34,2)
Печень							
Цитоплазма	1122,0 (250,3; 1466,1)	1246,7 (783,9; 2482,4)	1066,8 (938,1; 2214,6)	1057,0 (1034,4; 2093,2)	922,7 (261,5; 995,7)	1225,48 (368,94; 1417,96)	1020,05 (581,20; 2267,31)
Митохондрии	0,0 (0,0; 32,1)	27,6 (0,0; 80,3)	26,6 (0,0; 32,5)	44,2 (24,4; 60,7)	24,8 (0,0; 55,3)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 23,5)

При этом как при внутривенном, так и при внутрижелудочном введении обращает на себя внимание существенный разброс полученных концентраций сукцината в гомогенатах органов.

Таким образом, в ходе настоящего исследования было установлено, что после однократного внутрижелудочного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг массы сукцинат быстро всасывается, попадает в системный кровоток и также быстро элиминирует. При этом не отмечается повышения содержания сукцината в цитоплазматической и митохондриальной фракциях миокарда, коры больших полушарий головного мозга и печени.

3.7. Влияние сукцината, входящего в состав Мексидола, на активность сукцинатных рецепторов SUCNR1 в клетках линии HepG2

На следующем этапе исследования оценивалось влияние сукцината, входящего в состав Мексидола, на активность сукцинатных рецепторов SUCNR1 в клетках линии HepG2.

Первоначально методом иммуноцитохимии было проанализировано наличие SUCNR1 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы HepG2. В ходе анализа выявлена иммунопозитивная реакция с мембранами клеток, что свидетельствует о наличии данных рецепторов в клеточной линии и их мембранной локализации (Рисунок 16).

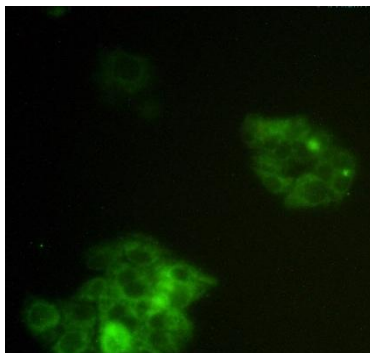


Рисунок 16 – Иммуноцитохимическая реакция клеток линии HepG2 с использованием антител к SUCNR1 (A08485, Boster, Китай), вторичных антител S0018 Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Fluor488-conjugated, Affinity Biosciences, КНР, увеличение $\times 400$ раз

Способность сукцината, входящего в состав Мексидола, влиять на активность сукцинатных рецепторов SUCNR1 оценивалась по уровню инозитолмонофосфата в лизате клеток. При активации SUCNR1 происходит увеличение концентрации данного вторичного мессенджера.

В ходе настоящего исследования было установлено, что при добавлении Мексидола в концентрации 100 мкМ к клеткам НерG2 в лизате клеток отмечалось повышение содержания инозитолмонофосфата через 15 и 30 минут инкубации на 53,8% ($p=0,016$) и 79,9% ($p=0,0016$) соответственно, а через 60 минут уровень мессенджера статистически значимо не отличался от показателя интактных клеток (Рисунок 17).

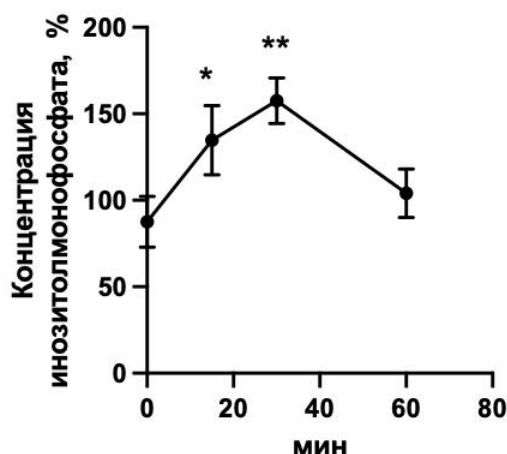


Рисунок 17 – Концентрация инозитолмонофосфата в клетках линии НерG2 при воздействии Мексидола

Примечание – * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – статистически значимые различия с уровнем инозитолмонофосфата в интактных клетках линии НерG2

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сукцинат, входящий в состав Мексидола, активирует сукцинатные рецепторы SUCNR1 в клетках линии НерG2.

3.8. Влияние сукцината, входящего в состав Мексидола, на активность сукцинатных рецепторов SUCNR1 в сердце и почках крыс wistar

На завершающем этапе исследования было изучено влияние сукцината,

входящего в состав Мексидола, на активность сукцинатных рецепторов SUCNR1 в сердце и почках крыс wistar. Для этого Мексидол вводили животным однократно внутривенно и внутрижелудочно в дозе 100 мг/кг массы. Через 15, 30, 60 и 90 минут после введения тестируемого препарата в гомогенатах сердца и почек анализировался уровень инозитолмонофосфата.

В ходе исследования было показано, что внутривенное введение Мексидола вызывало повышение уровня инозитолмонофосфата через 30 минут после введения в гомогенате сердца на 159,7% ($p=0,0016$) и в гомогенате почки на 71,9% ($p=0,0101$) по сравнению с показателями животных без введения препарата. Через 60 и 90 минут после введения уровень вторичного мессенджера достоверно от показателей интактных животных не отличался ($p>0,05$) (Рисунок 18).

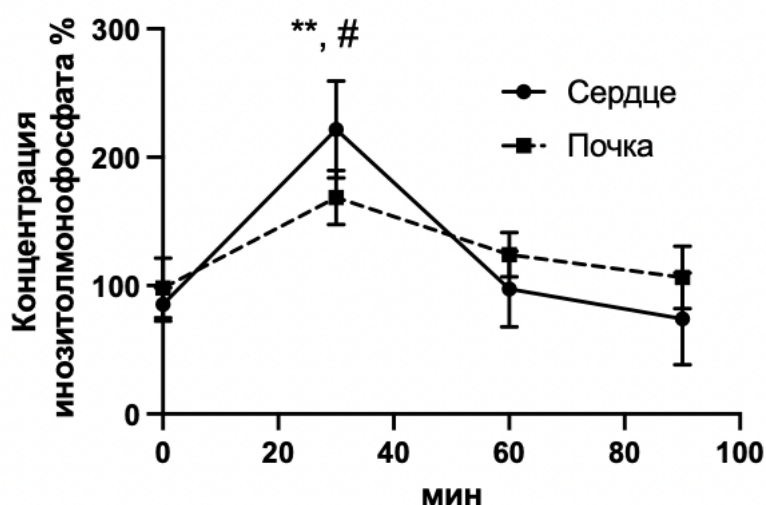


Рисунок 18 – Концентрация инозитолмонофосфата в гомогенатах сердца и почек крыс wistar после однократного внутривенного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг

Примечание – ** - $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями интактных животных в сердце, # - $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями интактных животных в почке.

При внутрижелудочном введении Мексидола наблюдалась тенденция к повышению уровня инозитолмонофосфата через 30 минут после введения в гомогенате почки на 49,2% ($p=0,06$) по сравнению с показателями животных без введения препарата, а в гомогенате сердца содержание вторичного посредника

статистически значимо не изменялось ($p>0,05$). Через 60 и 90 минут после введения Мексидола уровень инозитолмонофосфата также достоверно от показателей интактных животных не отличался ($p>0,05$) (Рисунок 19).

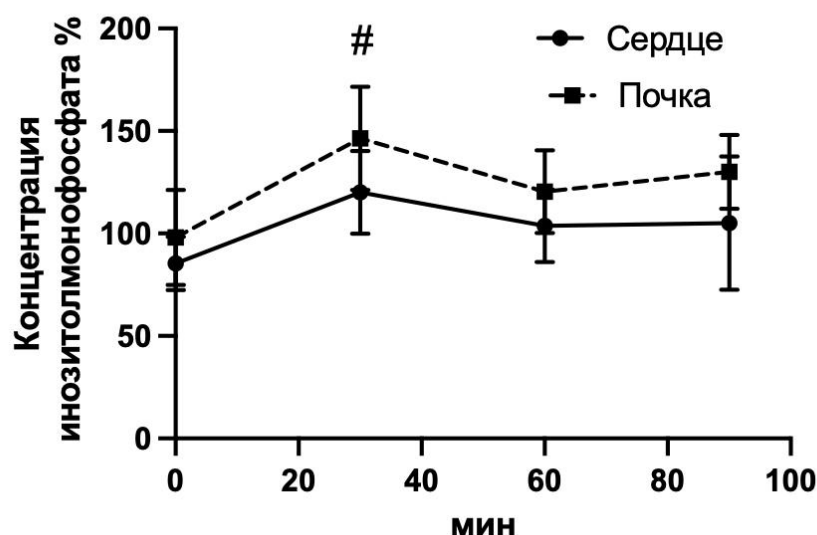


Рисунок 19 – Концентрация инозитолмонофосфата в гомогенатах сердца и почек крыс wistar после однократного внутрижелудочного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг

Примечание – # - $p=0,06$ – различия с показателями интактных животных в почке

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что однократное внутривенное введение Мексидола крысам wistar в дозе 100 мг/кг массы вызывает активацию SUCNR1 в сердце и почках, а внутрижелудочное – только тенденцию к активации в почках.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сукцинат, или янтарная кислота, находится в центре ЦТК и образуется главным образом с помощью сукцинил-КоА-синтетазы из сукцинил-КоА в обратимой реакции, которая обычно происходит в аэробных условиях. В дальнейшем под действием SDH сукцинат окисляется до фумарата в результате чего образуется два атома водорода, которые поступают в дыхательную цепь [69].

Однако сукцинат – это далеко не просто субстрат для SDH. Он также участвует в специфическом для макрофагов метаболическом пути, генерирующем итаконат [69]. Метаболизм сукцината тесно связан с метаболизмом аминокислот с разветвленной цепью и другими метаболитами, а также с синтезом гема, метаболизмом кетоновых тел и ГАМК-шунтом [92]. Помимо этого, сукцинат является критическим медиатором гипоксического ответа, а также участвует в канцерогенезе и в сукцинировании белков, недавно обнаруженном виде посттрансляционной модификации [147]. SDH играет важную роль в гомеостазе АФК в клетках, продуцируя супероксид и H_2O_2 , а также участвуя в их элиминации. Наконец, было обнаружено, что сукцинат оказывает свое действие вне клеток пара- и эндокринным способом, опосредованным экспрессией по меньшей мере одного типа плазмолеммальных SUCNR1 [154]. Все гены, кодирующие ферменты, участвующие в сукцинат-зависимых метаболических путях, подвержены мутациям, приводящим к различным патологиям, включая окислительный стресс, образование опухолей, нейродегенерацию и гипоксию [156].

Кратковременное воздействие янтарной кислоты облегчает дисфункцию окислительного фосфорилирования митохондрий мозжечка, нейродегенерацию и атаксию [129].

Системное воздействие янтарной кислоты индуцирует термогенез, зависящий от белка-разобщителя 1 (UCP1, *англ.: Uncoupling protein 1-dependent thermogenesis*), профилактирует ожирение, вызванное диетой, и улучшает толерантность к глюкозе [148,162]. Кроме того, янтарная кислота была

предложена в качестве потенциального средства лечения сепсиса [127], стимулятора гемопоэза [151] и регулятора канцерогенеза [147], благодаря ее способности вызывать эпигенетические изменения через свой рецептор SUCNR1. Таким образом, создание лекарственных препаратов, содержащих в своем составе сукцинат, является перспективным и патогенетически оправданным.

Несмотря на активное изучение биохимических и фармакологических эффектов янтарной кислоты ее фармакокинетика остается малоизученной. В доступной литературе имеются лишь единичные работы, в которых анализировалось изменение концентрации сукцината в организме человека и животных после введения янтарной кислоты или сукцинатсодержащих препаратов [17,42,100].

Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) – оригинальный российский лекарственный препарат, оказывающий нейропротекторное, антиоксидантное, противогипоксическое, противоишемическое, ноотропное, вегетотропное, антистрессорное, анксиолитическое, противосудорожное, антиалкогольное, кардиопротекторное, антиатерогенное, сахароснижающее, геропротекторное действие [13,57,59].

Фармакодинамика Мексидола продолжает активно изучаться в настоящее время, в частности установлено его влияние на апоптоз нейронов, нейропластичность, нейровоспаление, а также митохондриогенез [11,32]. Однако, способность сукцината, входящего в состав Мексидола стимулировать сукцинатные рецепторы практически не описана в доступной литературе.

Аналогичным образом, фармакокинетика этилметилгидроксипиридина, входящего в состав Мексидола, подробно описана в опытах *in vitro* и *in vivo*, а также в клинических исследованиях, а фармакокинетика сукцината, на данный момент не изучена.

Поэтому в рамках настоящего исследования изучалась фармакокинетика и фармакодинамика сукцината в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

На первом этапе исследования разрабатывалась и валидировалась аналитическая методика количественного определения сукцината в плазме крови

и тканях экспериментальных животных.

Так как янтарная кислота (сукцинат) является эндогенным веществом в холостых образцах плазмы крови крыс детектировались пики со временем удерживания, соответствующим времени удерживания сукцината. Были предприняты попытки устранения эндогенного сукцината (в ходе биохимической реакции превращения сукцината в сукцинил-CoA (Succinate Assay Kit (Colorimetric), Abcam ab204718) и твердофазной экстракцией), однако они не привели к полному избавлению от сукцината. Поэтому в ходе валидации была использована модельная матрица.

Модельную матрицу готовили следующим образом. К 1,8 мл плазмы добавляли 8 мл этилацетата, перемешивали на вортексе и инкубировали на шейкере в течение 15 мин. Полученный экстракт центрифугировали 10 мин при 3000 g. Супернатант упаривали в токе азота при 40°C. Полученный осадок растворяли в 1,8 мл 10% бычьего сывороточного альбумина, разведенного на физиологическом растворе.

Валидация биоаналитической методики была успешно выполнена по следующим параметрам: селективность; градуировочная кривая (линейность); правильность; прецизионность; нижний предел количественного определения; матричный эффект; извлечение; перенос пробы; стабильность; эффект разбавления.

Валидация аналитической методики количественного определения сукцината в лизате клеток и транспортной среде не проводилась, метод ничем не отличался от метода, используемого для анализа сукцината в модельной матрице и гомогенате органов. Транспортная среда представляет собой солевой раствор (раствор Хенкса с добавлением Хепес и ДМСО), а лизаты клеток готовились из одной и той же клеточной линии, культивирующихся в одних условиях.

Механизмы абсорбции сукцината, входящего в состав Мексидола, были изучены в опытах *in vitro* на клетках линии Сасо-2 в специальных трансвелл-системах. Трансвелл-системы представляют собой две камеры (апикальную и базолатеральную), разделенные полупроницаемой мембраной, на которую

высеивали клетки. Оценивали проницаемость сукцината из камеры донора в камеру реципиент в обоих направлениях. В ходе исследования было показано, что сукцинат, входящий в состав Мексидола по проникающей способности относится к веществам с хорошей проницаемостью, и превосходит по данному показателю препараты сравнения – фексофенадин и метотрексат.

Однако, так как сукцинат является заряженной молекулой, хорошо растворимой в воде, то он должен был плохо проникать через билипидные мембраны. Хорошая проницаемость сукцината, выявленная в нашем исследовании, может быть обусловлена участием специфических переносчиков в данном процессе. Показано, что в клетках Сасо-2 транспорт сукцината осуществляется в основном Na^+ -зависимыми путями, преимущественно NaDC1 и NaCT. Экспрессия этих транспортеров в клетках Сасо-2 была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР и установлена их локализация на апикальной мембране [163]. То есть с помощью этих транспортеров осуществляется транспорт сукцината из апикальной в базолатеральную камеру.

MCT1 (ген *SLC16A1*) – другой транспортер сукцината. Описана его локализация как на апикальной мембране Сасо-2 [108], так и на базолатеральной мембране энтероцитов [74]. Классически MCT1 является инфлюксным транспортером, то есть обеспечивающим транспорт веществ внутрь клеток [89]. Однако, было показано, что MCT1 может переносить сукцинат во внеклеточное пространство через плазматическую мембрану миокарда, скелетных мышц и сетчатки [90,104,112].

Таким образом, можно предположить, что транспорт сукцината из базолатеральной камеры в апикальную опосредуется данными транспортерами.

Отношение $\text{Papp } b\text{-}a/\text{Papp } a\text{-}b$ сукцинат составило $1,28 \pm 0,07$, что свидетельствует об отсутствии выраженной асимметрии транспорта сукцината через монослой клеток Сасо-2, хотя транспорт из базолатеральной камеры несколько преобладает над транспортом в обратном направлении.

При этом для фексофенадина было выявлено преобладание *ba*-транспорта над *ab*-транспортом, вследствие эффлюкса фексофенадина транспортером – Р-

гликопротеином [83, 101], а для метотрексата, наоборот, было показано преобладание *ab*-транспорта над *ba*-транспортом за счет работы переносчика RFC1 [111].

Аналогичные результаты были получены и для молекулы метилсукцината – транспорт из базолатерной камеры в апикальную преобладал над транспортом в обратном направлении [163].

На следующем этапе было оценено влияние добавления Мексидола к клеткам НерG2 на уровень внутриклеточного сукцината. Было показано, что добавление Мексидола к монослою клеток НерG2 в концентрации 1 и 10 мкМ достоверно не влияло на концентрацию янтарной кислоты во все сроки инкубации – 15, 30 и 60 мин. В то же время при добавлении Мексидола в концентрации 100 мкМ отмечалось повышение уровня янтарной кислоты через 30 мин. Полученные данные свидетельствуют о том, что сукцинат, входящий в состав Мексидола, при попадании внутрь клеток быстро метаболизируется.

Затем была изучена фармакокинетика сукцината после внутривенного и внутрижелудочного введения Мексидола крысам-самцам wistar.

После внутривенного введения Мексидола плазменная концентрация сукцината достигала максимального значения через 1 минуту, затем быстро снижалась, хотя к 90 минуте была выше показателей интактных крыс.

$T_{1/2}$ сукцината составил $13,19 \pm 2,07$ мин, Cl – $60,73 \pm 24,06$ мл/мин, MRT – $8,36 \pm 1,32$ мин. Эти данные свидетельствуют о том, что сукцинат после внутривенного введения Мексидола быстро выводился из организма крыс, при этом он равномерно распределялся по организму, проникая в органы и ткани, и не депонировался: объем распределения составил $1188,92 \pm 620,44$ мл/кг, если принять за среднюю массу крысы 200 г, то 237,784 мл (т.е. примерно равен объему животного).

При оценке камерности фармакокинетической модели сукцината после его однократного внутривенного введения установлено, что более точно концентрацию сукцината в плазме крови описывает двухкамерная фармакокинетическая модель.

Внутривенное введение Мексидола в дозе 100 мг/ кг приводило в миокарде и печени крыс к повышению концентрации сукцината в цитоплазматической и митохондриальной фракциях через 10 мин после введения. В коре больших полушарий уровень сукцината увеличился в цитоплазматической фракции через 1 и 10 минут, в митохондриальной – через 10 минут.

При этом обращает на себя внимание разный уровень сукцината в разных органах. Минимальная концентрация сукцината отмечалась в миокарде, средняя в мозге, а максимальная отмечалась в печени.

Установленные нами различия в содержании сукцината в исследуемых органах могут быть обусловлены разной скоростью кровотока в тканях, функционированием гистогематических барьеров, специфической тропностью сукцината к органам и тканям, а также различиями в их метаболической активности. Максимальный кровоток у крыс отмечается в сердце – $3,27 \pm 0,30$ мл/мин/г, в мозге он составляет $1,02 \pm 0,12$ мл/мин/г, а минимальная скорость кровотока наблюдается в печени – $0,10 \pm 0,01$ мл/мин/г [70]. Следовательно, если бы распределение сукцината определялось исключительно интенсивностью кровотока, то максимальное его количество фиксировалось в миокарде, а минимальное – в печени. Однако в данном исследовании в большинстве случаев максимальные концентрации сукцината, наоборот, наблюдались в печени.

Наибольшей метаболической активностью обладает миокард (8986,52 Дж/г в день) и почти в 2 раза превосходит по данному показателю мозг (4901,74 Дж/г) и печень (4084,78 Дж/г) [122]. Кроме того, сукцинатзависимый II комплекс играет основную роль в функционировании дыхательной цепи в миокарде, тогда как в печени и головном мозге первостепенную роль выполняет NADH-зависимый I комплекс [26]. Таким образом, более низкие концентрации сукцината в миокарде могут быть объяснены его активным использованием в метаболических процессах, протекающих в миокарде. Данное предположение согласуется с концентрациями эндогенного сукцината, полученными у интактных животных. В цитоплазматической фракции его максимальный уровень отмечался в печени. При этом полученные нами результаты согласуются с данными литературы:

максимальная концентрация сукцината выявлена в печени, минимальная — в миокарде [99].

Следует отметить, что активность СДГ в миокарде у высокоустойчивых к гипоксии крыс существенно превышает таковую у низкоустойчивых [105], что может объяснять разброс полученных нами результатов (в настоящее исследование включались животные без оценки устойчивости к гипоксии).

Высокие концентрации сукцината в ткани коры больших полушарий свидетельствуют о том, что вещество проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Учитывая, что сукцинат является заряженной молекулой и должен плохо проникать через ГЭБ, его проникновение в головной мозг, выявленное в нашем исследовании, свидетельствует об участии в транспорте сукцината специфического транспортера.

Например, показана экспрессия МСТ1 в ГЭБ [84,158], способного переносить сукцинат.

Полученные результаты также уточняют фармакодинамику сукцината, входящего в состав Мексидола: $T_{1/2}$ сукцината $13,19 \pm 2,07$ мин свидетельствует о том, что он быстро элиминирует из организма, поэтому его антигипоксическое действие, скорее всего, связано не с поддержанием активности дыхательной цепи (где он выступает в качестве субстрата), а со стимуляцией сукцинатных рецепторов GPR91 и запуском биохимических каскадов.

Мексидол вызывает у молодых и стареющих крыс индукцию GPR91, транскрипционного коактиватора PGC-1 α , транскрипционных факторов NRF1, TFAM, каталитических субъединиц дыхательных ферментов и АТФ-синтазы [53]. В эксперименте на крысах установлено, что курсовое внутрибрюшинное введение Мексидола способствовало повышению уровня каталитических субъединиц дыхательных ферментов митохондрий (NDUFV2, SDHA, cyt b, COX1), АТФ-синтазы (ATP5A), VEGF и GPR91, особенно выраженному у неустойчивых к гипоксии особей [22].

В настоящем исследовании внутрижелудочное введение Мексидола в дозе 100 мг/кг приводило к повышению содержания сукцината в плазме крови крыс

уже через 5 минут после введения, которое достигало максимального значения к 10 минутам и снижалось к 30 минутам, достоверно не отличаясь от значений нормы. $T_{1/2}$ составил $17,10 \pm 11,82$ мин, MRT – $30,98 \pm 30,21$ мин. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сукцинат после внутрижелудочного введения Мексидола быстро всасывается, попадает в системный кровоток и также быстро элиминирует. Абсолютная биодоступность сукцината составила 1,4%.

Внутрижелудочное введение Мексидола достоверно не влияло на уровень сукцината в цитоплазматической и митохондриальной фракциях миокарда, коры больших полушарий головного мозга и печени крыс.

Отмечалась лишь тенденция к его повышению в митохондриальной фракции коры больших полушарий через 15 минут после введения и в митохондриальной фракции печени через 10 минут.

Таким образом, из-за низкой биодоступности сукцинат после внутрижелудочного введения Мексидола в низком количестве проникает в органы и ткани.

На следующем этапе исследования оценивалось влияние сукцината, входящего в состав Мексидола, на активность SUCNR1 в клетках HepG2.

Первоначально методом иммуноцитохимии было проанализировано наличие SUCNR1 в клетках HepG2. В ходе исследования была выявлена иммунопозитивная реакция с мембранами клеток, что свидетельствует о наличии данных рецепторов в клеточной линии и их мембранной локализации.

Способность сукцината, входящего в состав Мексидола, влиять на активность SUCNR1 оценивалась по уровню инозитолмонофосфата в лизате клеток. При активации SUCNR1 происходит увеличение концентрации данного вторичного мессенджера.

В ходе настоящего исследования было установлено, что при добавлении Мексидола в концентрации 100 мкМ к клеткам HepG2 в лизате клеток отмечалось повышение содержания инозитолмонофосфата через 15 и 30 минут инкубации. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сукцинат, входящий в состав Мексидола, активирует SUCNR1 в клетках HepG2.

Затем было изучено влияние сукцината, входящего в состав Мексидола, на активность SUCNR1 в сердце и почках крыс wistar. Для этого Мексидол вводили животным однократно внутривенно и внутрижелудочно в дозе 100 мг/кг и через 15, 30, 60 и 90 минут после введения в гомогенатах сердца и почек анализировался уровень инозитолмонофосфата.

В ходе исследования было показано, что внутривенное введение Мексидола вызывало повышение уровня инозитолмонофосфата через 30 минут после введения в гомогенате сердца и в гомогенате почки по сравнению с показателями животных без введения препарата, а при внутрижелудочном введении Мексидола наблюдалась тенденция к повышению уровня инозитолмонофосфата через 30 минут после введения только в гомогенате почки, а в гомогенате сердца его концентрация существенно не изменялась.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что внутривенное однократное введение Мексидола крысам wistar в дозе 100 мг/кг массы вызывает активацию сукцинатных рецепторов SUCNR1 в сердце и почках, а внутрижелудочное – только тенденцию к активации в почках.

Полученные данные согласуются с данными литературы, согласно которым сукцинат стимулирует свои рецепторы в концентрациях 50 - 500 мкМ [140], которые были получены после внутривенного введения Мексидола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования *in vitro* на двух клеточных линиях Сасо-2 и НерG2 и *in vivo* на крысах-самцах wistar изучена фармакокинетика и фармакодинамика сукцината при применении Мексидола.

В ходе работы было установлено, что при добавлении Мексидола к культурам клеток сукцинат быстро проникает через монослой клеток Сасо-2 и внутрь клеток НерG2.

При однократном внутривенном введении Мексидола сукцинат быстро выводится из кровотока и достигает цитоплазматической и митохондриальной фракций миокарда, печени и коры больших полушарий головного мозга, а при однократном внутрижелудочном введении сукцинат быстро всасывается и элиминируется при минимальном изменении его уровня в исследованных клеточных фракциях.

Мексидол при длительности экспозиции 15 и 30 минут в клетках линии НерG2 и при однократном внутривенном введении крысам-самцам wistar в дозе 100 мг/кг массы в сердце и почках вызывает активацию SUCNR1.

ВЫВОДЫ

1. Разработана и валидирована методика количественного определения сукцината в плазме крови (200-20 000 нг/мл) и гомогенатах органов крыс (20-5000 нг /мл), а также в транспортной среде и лизате клеток НерG2 (20-5000 нг /мл) с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

2. Сукцинат быстро проникает через монослой клеток линии Сасо-2 после добавления Мексидола. Он также проникает внутрь клеток НерG2, но быстро (к 60 мин) подвергается в них метаболизму.

3. После однократного внутривенного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг крысам-самцам wistar были получены следующие фармакокинетические параметры сукцината: $C_{\max}$ – 237,68±110,21 мкг/мл, AUC_{0-t} – 845,06±342,27 мкг/мл×мин, $AUC_{0-\infty}$ – 858,17±346,86 мкг/мл×мин, K_{el} – 0,05±0,01 мин⁻¹, $T_{1/2}$ – 13,19±2,07 мин, Cl – 60,73±24,06 мл/мин, MRT – 8,36±1,32 мин. Сукцинат проникает в цитоплазматическую и митохондриальную фракцию миокарда, коры больших полушарий головного мозга и печени, однако повышение уровня сукцината носит кратковременный характер.

4. После однократного внутрижелудочного введения Мексидола в дозе 100 мг/кг крысам-самцам wistar были получены следующие фармакокинетические параметры сукцината: $C_{\max}$ 1,13±1,09 мкг/мл, $T_{\max}$ 10,00 (5,00; 10,00) мин, AUC_{0-t} 12,09±6,89 мкг/мл×мин, $AUC_{0-\infty}$ – 15,68±9,71 мкг/мл×мин, K_{el} 0,09±0,11 мин⁻¹, $T_{1/2}$ 17,10±11,82 мин, Cl/F 100,48±64,42 л/мин, MRT 30,98±30,21 мин. При этом уровень сукцината в цитоплазматической и митохондриальной фракциях миокарда, коры больших полушарий головного мозга и печени крыс существенно не повышается.

5. Мексидол в концентрации 100 мкМ и при длительности экспозиции 15 и 30 минут активирует SUCNR1 в клетках линии НерG2.

6. Однократное внутривенное введение Мексидола крысам-самцам wistar в дозе 100 мг/кг массы вызывает активацию SUCNR1 в сердце и почках. Внутрижелудочное введение Мексидола в аналогичной дозе не оказывает достоверного влияния на активность SUCNR1 в данных органах.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанную и валидированную методику анализа концентрации сукцината в плазме крови и в гомогенате органов, можно использовать в исследованиях для оценки уровня данного эндогенного метаболита.

2. Учитывая быструю элиминацию сукцината после внутривенного введения Мексидола, можно рекомендовать внутривенно-капельное введение данного препарата для длительного поддержания эффективной концентрации янтарной кислоты.

3. Внутривенное введение Мексидола в дозе 100 мг/кг крысам wistar и добавление его к клеткам линии HepG2 в концентрации 100 мкМ можно использовать для индукции SUCNR1.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Целесообразно выполнение клинических фармакокинетических исследований для оценки концентрации сукцината после внутривенного, внутримышечного и перорального введения Мексидола.
2. Перспективно изучение фармакокинетики сукцината после введения других сукцинатсодержащих лекарственных препаратов, а также оценка их влияния на сукцинатные рецепторы SUCNR1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией

ГАМК – γ -аминомасляная кислота

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДК – дендритные клетки

ИОЗСН – ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина

ЛПС – липополисахарид

НАДН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида

НПКО – нижний предел количественного определения

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

Akt – протеинкиназа В (англ.: protein kinase B)

Ang – ангиопоэтин (англ.: angiopoietin)

α -sma – альфа-гладкомышечный актин (англ.: alpha smooth muscle actin)

АТР5А – ген, кодирующий альфа-субъединицу (α -субъединицу)

митохондриальной АТФ-синтазы (англ.: alpha subunit F1 of ATP synthase)

BCRP – белок, обуславливающий устойчивость рака молочной железы (англ.: Breast Cancer Resistance Protein)

BDNF – нейротрофический фактор мозга (англ.: brain-derived neurotrophic factor)

Caco-2 – клеточная линия аденокарциномы толстой кишки человека (англ.: colon adenocarcinoma clone 2)

С/ЕВР β – ССААТ/энхансер-связывающий белок бета (англ.: CCAAT/enhancer-binding protein beta)

COX2 – цитохром с оксидаза субъединица 2 (англ.: cytochrome c oxidase subunit 2)

cyt b – цитохром b (англ.: cytochrome b)

DMEM – Дульбекко модифицированная среда Игла (англ.: Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Drp1– динамин-связанный белок 1 (англ.: dynamin-related protein 1)

ERK – внеклеточные сигнал-регулируемые киназы (англ.: Extracellular signal-Regulated Kinase)

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (англ.: Food and Drug Administration)

GPCR – G-белок-сопряженные рецепторы (англ.: G protein-coupled receptors)

GPR91 – сукцинатный рецептор (англ.: G protein-coupled receptor 91)

HEK293 – человеческие эмбриональные клетки почек 293 (англ.: Human Embryonic Kidney 293)

HepG2 – клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека (англ.: Hepatic cell line G2)

HIF-1 α – индуцируемый гипоксией фактор 1-альфа (англ.: hypoxia-inducible factor 1-alpha)

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1 (англ.: insulin-like growth factor 1)

JGA – юктагломерулярный аппарат (англ.: juxtaglomerular apparatus)

MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы (англ.: mitogen-activated protein kinases)

MCT – транспортеры монокарбоксилатов (англ.: monocarboxylate transporters)

MDCK – клетки почек собаки Мадина-Дарби (англ.: Madin–Darby Canine Kidney cells)

MFF – митохондриальный фактор деления (англ.: mitochondrial fission factor)

MRM – режим мониторинга множественных реакций (англ.: Multiple Reaction Monitoring)

NDUFV2 – НАДН-дегидрогеназный комплекс (англ.: NADH dehydrogenase ubiquinone flavoprotein 2)

- NRF – ядерный респираторный фактор (англ.: nuclear respiratory factor)
- OAT – транспортеры органических анионов/дикарбоксилатов (англ.: organic anion transporters)
- OATP1B1 – полипептид, транспортирующий органические анионы 1B1 (англ.: Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1)
- Pgp – гликопротеин - Р (англ.: permeability glycoprotein)
- PGC-1 α – транскрипционный коактиватор клеточного метаболизма, митохондриального биогенеза и дифференцировки клеток (англ.: peroxisome proliferator – activated receptor gamma coactivator 1-alpha)
- PKC – протеинкиназа С (англ.: protein kinase C)
- PKC δ – протеинкиназа С дельта (англ.: protein kinase C delta)
- PLC – фосфолипаза С (англ.: phospholipase C)
- SDH – сукцинатдегидрогеназа (англ.: succinate dehydrogenase)
- SDHA – это ген, кодирующий первую субъединицу сукцинатдегидрогеназного комплекса (англ.: succinate dehydrogenase flavoprotein subunit A)
- SLC – семейство переносчиков растворенных веществ (англ.: solute carrier family)
- Src – тирозин-протеинкиназа с-Src (англ.: sarcoma)
- SRM – режим мониторинга селективных реакций (англ.: selected reaction monitoring)
- SUCNR1 – сукцинатный рецептор (англ.: succinate receptor 1)
- TGF- β – трансформирующий фактор роста бета (англ.: transforming growth factor-beta)
- TFAM – транскрипционный фактор А митохондрий (англ.: mitochondrial transcription factor A)
- TMZ – темозоломид (англ.: Temozolomide)
- TNF α – фактор некроза опухоли α (англ.: tumor necrosis factor-alpha)
- UCP1 – разобщающий белок 1 (англ.: Uncoupling protein 1-dependent thermogenesis)
- VASP – фосфопротеин, стимулируемый вазодилататором (англ.: vasodilator-stimulated phosphoprotein)

VDAC – вольтаж-зависимый анионный канал (англ.: voltage-dependent anion channel)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (англ.: vascular endothelial growth factor)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдухаликова, Н.Ф. Роль сукцинатдегидрогеназы в механизмах гипоксии / Н.Ф. Абдухаликова, Х. Халилов – Текст : непосредственный // Advanced methods of ensuring the quality of education: problems and solutions. – 2025. – Т. 2, № 11. – С. 55-61.
2. Афанасьев, В.В. Реамберин – новое средство для инфузионной терапии в практике современной медицины / В.В. Афанасьев – Текст : непосредственный // Вестник интенсивной терапии. – 2005. – № 4. – С. 3–12.
3. Боголепова, А.Н. Послеоперационная когнитивная дисфункция / А.Н. Боголепова – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. – Т. 122, № 8. – С. 7–11.
4. Бубнова, М.Г. Место β -адреноблокаторов в лечении сердечно-сосудистых заболеваний с позиции современных рекомендаций: в фокусе метопролола сукцинат CR/XL / М.Г. Бубнова – Текст : непосредственный // CardioСоматика. – 2022. – Т. 13, № 1. – С. 51-62.
5. Васильева, Т.Е. Медикаментозная терапия алкогольной интоксикации препаратами безрецептурного отпуска / Т.Е. Васильева, Е.А. Зверева – Текст : непосредственный // Современные проблемы естественных наук и фармации: сборник статей Всероссийской научной конференции, Йошкар-Ола, 16–20 мая 2022 года. – 2022. – Т. 11. – С. 289-292.
6. Влияние Мексидола на уровень маркеров нейрогенеза при остром нарушении мозгового кровообращения в эксперименте / А.В. Щулькин, И.В. Черных, Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2025. – Т. 125, № 2. – С. 107-112.
7. Влияние Мексидола на экспрессию транскрипционного фактора Nrf2 в коре больших полушарий головного мозга при экспериментальной ишемии / Е.Н. Якушева, П.Ю. Мыльников, И.В. Черных, А.В. Щулькин. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т. 118, № 5. – С. 64-68.

8. Влияние Мексидола на экспрессию фактора, индуцируемого гипоксией HIF-1 α , в коре больших полушарий головного мозга крыс при ишемии / Е.Н. Якушева, П.Ю. Мыльников, И.В. Черных, А.В. Щулькин. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2017. – Т. 117, № 10. – С. 87-91.

9. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, М.О. Порошина, А.Н. Рябков [и др.]. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2022. – Т. 85, № 6. – С. 14-18.

10. Влияния мексидола на соотношение 6 β -гидрокортизол/свободный кортизол. Возможная индукция CYP3A4 / П.А. Баранов, С.А. Апполонова, Г.М. Родченков [и др.]. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 11. – С. 39-40.

11. Воронина Т.А. Экспериментальное обоснование применения антигипоксанта мексидола при нарушениях мозгового кровообращения и нейродегенеративных заболеваниях / Т.А. Воронина, Л.Д. Смирнов, А.В. Гудашева. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № 4. – С. 35–42.

12. Воронина, Т.А. Геропротективные эффекты этилметилгидроксипиридина сукцината в экспериментальном исследовании / Т.А. Воронина. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2020. – Т. 4. – С. 81-87.

13. Воронина, Т.А. Известные и новые представления о механизме действия и спектре эффектов Мексидола / Т.А. Воронина. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2025. – Т. 125, № 5. – С. 22-33.

14. Воронина, Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов / Т.А. Воронина. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – Т. 112, № 12. – С. 86-90.

15. Выбор режима дозирования современных β -адреноблокаторов в разных

клинических ситуациях (на примере метопролола сукцината) / А.С. Скотников, В.Д. Закиев, А.Д. Гвоздева, В.В. Лазарева. – Текст : непосредственный // Клинический разбор в общей медицине. – 2024. – Т. 5, № 10. – С. 52-63.

16. Ерофеева, С.Б. Место препарата мексидол в профилактике и лечении цереброваскулярных заболеваний / С.Б. Ерофеева. – Текст : непосредственный // Фарматека. – 2009. – Т. 11. – С. 34-38.

17. Жердев В.П. Фармакокинетика водорастворимого антиоксиданта из класса 3-оксипиридина и метаболитов цикла Кребса / В.П. Жердев, А.К. Сариев, А.А. Дворянинов. – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1986. – Т. 101, № 3. – С. 325–327.

18. Ильченко, Л.Ю. Ремаксол: механизмы действия и применение в клинической практике. Часть 2 / Л.Ю. Ильченко, С.В. Оковитый. – Текст : непосредственный // Архивъ внутренней медицины. – 2016. – Т. 29, № 3. – С. 8-18.

19. Кан, Т.В. Эффективность цитофлавина в оптимизации фармакотерапии черепно-мозговой травмы / Т.В. Кан, Н.В. Симонова, А.Ч. Кан. – Текст : непосредственный // Российский неврологический журнал. – 2022. – Т. 27, № 2. – С. 85-92.

20. Кинетика выведения мексидола и его глюкуроноконъюгата с мочой больных / А.К. Сариев, В.П. Жердев, А.А. Литвин [и др.]. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1999. – Т. 62, № 5. – С. 42-46.

21. Кинетика экскреции мексидола и его глюкуроноконъюгированного метаболита у добровольцев популяций казахов и русских / А.К. Сариев, О.Ю. Кравцова, В.П. Жердев [и др.]. – Текст : непосредственный // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2005. – Т. 1. – С. 23-28.

22. Кирова Ю.И. Новые аспекты энерготропного действия мексидола / Ю.И. Кирова, Э.Л. Германова. – Текст : непосредственный // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т. 62, № 4. – С. 36-40.

23. Кулешова, Э.В. Что обеспечивает клиническую эффективность

метопролола? / Э.В. Кулешова. – Текст : непосредственный // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2010. – Т. 6, № 3. – С. 370-375.

24. Лазарев, В.В. Сукцинатсодержащие препараты в структуре терапевтических средств у больных в неотложных состояниях / В.В. Лазарев, И.В. Гадомский. – Текст : непосредственный // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 111–116.

25. Лукьянова, Л.Д. Сигнальная роль митохондрий при адаптации к гипоксии / Л.Д. Лукьянова. – Текст : непосредственный // Физиологический журнал. – 2013. – Т. 59, № 6. – С. 141–154.

26. Лукьянова, Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии / Л.Д. Лукьянова. – Москва: Российская академия наук, 2019. – 215 с. – Текст : непосредственный.

27. Максимова, М.Ю. Комбинированное действие янтарной кислоты, рибоксина, никотинамида, рибофлавина при лечении хронической ишемии головного мозга / М.Ю. Максимова. – Текст : непосредственный // Медицинский совет. – 2022. – Т. 16, № 21. – С. 20-26.

28. Механизм стимуляции миогенеза под действием этилметилгидроксипиридина сукцината / Ю.В. Абаленихина, М.О. Исаева, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2024. – Т. 58, № 6. – С. 10-17.

29. Морфофункциональная характеристика печени и поджелудочной железы при воздействии гепатопротектора Ремаксол на фоне острого алкогольного воздействия у крыс / С.Н. Стяжкина, Т.Г. Глушкова, Н.А. Кирьянов [и др.]. – Текст : непосредственный // Эффективная фармакотерапия. – 2024. – Т. 20, № 2. – С. 26-29.

30. Мыльников, П.Ю. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функционирование гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере в норме и при острой гипоксической гипобарической гипоксии: специальность 3.3.6. «Фармакология, клиническая фармакология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Мыльников Павел Юрьевич; Рязанский гос. медицинский ун-т им. акад. И.П. Павлова. – Рязань, 2021.

– 24 с.: ил. – Место защиты: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова». – Текст : непосредственный.

31. Нарциссов, Я.Р. Метаболитная терапия как составная часть комплексного лечения хронических заболеваний / Я.Р. Нарциссов, М.Л. Максимов, Л.Н. Максимова. – Текст : непосредственный // РМЖ. – 2016. – Т. 24, № 14. – С. 894-900.

32. Новиков В.Е. Перспективы применения антигипоксантов в лечении митохондриальных дисфункций / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова, Е.Н. Иванцова. – Текст : непосредственный // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2020. – № 1.

33. Оковитый, С.В. Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии / С.В. Оковитый, С.В. Радько, Е.Б. Шустов. – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 9. – С. 3-7.

34. Орлов, Ю.П. Энергетический дефицит при критических состояниях: значение сукцинатов / Ю.П. Орлов. – Текст : непосредственный // Медицина неотложных состояний. – 2016. – Т. 7, № 78. – С. 124-131.

35. Оценка когнитивных функций у больных в отдаленном периоде черепно-мозговой травмы / Н.Г. Браш, Н.В. Симонова, М.И. Архипова, А.В. Шпинёв. – Текст : непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21, № S2. – С. 30-31.

36. Оценка эффективности и безопасности цитофлавина в качестве нейропротектора на основе систематического обзора / Е.К. Красова, И.А. Титович, К.О. Сидоров, С.В. Оковитый. – Текст : непосредственный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14, № 1. – С. 285–318.

37. Патент № 2464018 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/138, А61К 31/205, А61К 47/38. Фармацевтическая композиция для лечения сердца пролонгированного действия: № 2011109432/15: заявл. 15.03.2011: опубл. 20.10.2012 / С.В. Емшанова, Н.И. Юрченко, Н.Б. Драгунова [и др.]. – 7 с.

38. Применение меглюмина натрия сукцината в лечении пациентов с

острым панкреатитом (результаты наблюдательного исследования) / А.Ю. Яковлев, И.С. Симутис, В.С. Афончиков [и др.]. – Текст : непосредственный // Анестезиология и реаниматология. – 2023. – № 3. – С. 24-31.

39. Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС / П.Ю. Мыльников, Ю. Транова, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева. – Текст : непосредственный // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2021. – Т. 1. – С. 45–51.

40. Реамберин: инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения / ООО «НТФФ «ПОЛИСАН». – Санкт-Петербург, 2025. – Рег. уд. № ЛП-000376. – URL: https://www.vidal.ru/drugs/reamberin_41895 (дата обращения: 22.02.2026). – Текст : электронный.

41. Результаты многоцентрового международного исследования эффективности и безопасности препарата «Ремаксол» у пациентов с лекарственными поражениями печени на фоне противоопухолевой терапии / Р.А. Зуков, М.В. Копп, А.В. Султанбаев [и др.]. – Текст : непосредственный // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2025. – Т. 14, № 5. – С. 26-33.

42. Сариев, А.К. Фармакокинетика производных 3-оксипиридина в эксперименте: специальность 14.00.25 «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Сариев Абрек Куангалиевич; АМН СССР, НИИ фармакологии. – Москва, 1986. – 173 с. – Текст : непосредственный.

43. Сас, Е.И. Многокомпонентные инфузионные гепатопротекторы при лекарственном поражении печени / Е.И. Сас, В.Б. Гриневич. – Текст : непосредственный // Медицинский совет. – 2019. – № 3. – С. 84-88.

44. Соколова, Л.П. Влияние алкоголя на нервную систему, работоспособность и творчество / Л.П. Соколова, Е.В. Старых. – Текст : непосредственный // Нервные болезни. – 2022. – № 2. – С. 42-48.

45. Стельмах, В.В. Метаболический корректор реамберин в комплексной терапии больных острым вирусным гепатитом / В.В. Стельмах, А.Л. Коваленко, О.С. Кетлинская. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и

клиническая фармакология. – 2025. – Т. 86, № 9. – С. 27-35.

46. Супонева, Н.А. Опыт применения препарата Цитофлавин в терапии диабетической полинейропатии / Н.А. Супонева, А.С. Арестова. – Текст : непосредственный // Эффективная фармакотерапия. – 2025. – Т. 21, № 17. – С. 16-20.

47. Тарасова, Л.В. Эффективность препарата Ремаксол в комплексной терапии хронического вирусного гепатита С / Л.В. Тарасова, Ю.В. Цыганова. – Текст : непосредственный // ТЕРАПИЯ. – 2024. – Т. 10, № 8. – С. 139-143.

48. Транова, Ю. Разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP in vitro: специальность 3.3.6. «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Транова Юлия; Рязанский гос. медицинский университет им. акад. И.П. Павлова. – Рязань, 2023. – 146 с. – Текст : непосредственный.

49. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешни; пер. с англ. – 4-е изд., испр. и доп. – Москва: Лаборатория знаний, 2018. – 791 с. – Текст : непосредственный.

50. Характеристика фармацевтической субстанции суматриптана сулцинат при изучении острой и субхронической токсичности на лабораторных животных / Е.К. Власенко, В.Н. Гапанович, С.В. Андреев. – Текст : непосредственный // Сборник материалов международной научно-практической конференции «Здоровье и окружающая среда», посвященной 95-летию республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены», Минск, 24-25 ноября 2022 г. – 2022. – С. 432-436.

51. Цитофлавин: инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения: таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой / ООО «НТФФ «ПОЛИСАН». – Санкт-Петербург, 2025. – Рег. уд. № ЛП-001766. – URL: <https://www.rlsnet.ru/drugs/citoflavin-19983> (дата обращения: 22.02.2026). – Текст : электронный.

52. Цитофлавин: инструкция по применению лекарственного препарата для

медицинского применения: раствор для внутривенного введения / ООО «НТФФ «ПОЛИСАН». – Санкт-Петербург, 2025. – Рег. уд. № ЛП-000376. – URL: <https://www.rlsnet.ru/drugs/citoflavin-41895> (дата обращения: 22.02.2026). – Текст : электронный.

53. Чуканова, Е.И. Гипоксия и оксидантный стресс при недостаточности мозгового кровообращения и эффективные пути их коррекции / Е.И. Чуканова, А.С. Чуканова, Д.М. Родионова. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. – Т. 122, № 8. – С. 35–40.

54. Щулькин, А.В. Мексидол: современные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики / А.В. Щулькин. – Текст : непосредственный // Фарматека. – 2016. – Т. 4, № 16. – С. 65-71.

55. Щулькин, А.В. Распределение мексидола в структурах головного мозга, его клеточных элементах и субклеточных фракциях / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных. – Текст : непосредственный // Ремедиум Приволжье. – 2014. – Т. 8, № 128. – С. 22-23.

56. Щулькин, А.В. Регуляция функционирования гликопротеина-Р гормональными лекарственными средствами: специальность 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Щулькин Алексей Владимирович; Рязанский гос. медицинский ун-т им. акад. И.П. Павлова. – Рязань, 2019. – 283 с. – Место защиты: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова». – Текст : непосредственный.

57. Щулькин, А.В. Современные представления об антигипоксическом и антиоксидантном эффектах мексидола / А.В. Щулькин. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии. – 2018. – Т. 12, № 2. – С. 87–93.

58. Щулькин, А.В. Сравнение фармакокинетических параметров препарата мексидол с препаратом этилметилгидроксипиридина сукцинат / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии. – 2014. – Т. 114, № 11-2. – С. 40–43.

59. Эффективность Мексидола у пациентов разных возрастных групп с хронической ишемией головного мозга с когнитивными нарушениями (результаты субанализа международного многоцентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования МЕМО) / В.В. Захаров, О.Н. Ткачева, Э.А. Мхитарян, А.И. Федин. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. – Т. 122, № 11. – С. 1-8.

60. Эффективность ремаксола у пациентов с алкогольной болезнью печени / В.В. Стельмах, И.Г. Бакулин, А.Л. Коваленко, В.К. Козлов. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2022. – Т. 85, № 6. – С. 25-31.

61. Яковлев, А.Ю. Реамберин в практике инфузионной терапии критических состояний: практические рекомендации / А.Ю. Яковлев. – Санкт-Петербург: Тактик-Студио, 2008. – 32 с. – ISBN 5-89720-078-5. – Текст : непосредственный.

62. Яковлев, А.Ю. Реамберин в практике инфузионной терапии критических состояний / А.Ю. Яковлев. – Текст : непосредственный // Медицинский алфавит. Неотложная медицина. – 2022. – Т. 3. – С. 54–57.

63. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release / S.L. Vargas, I. Toma, J.J. Kang [et al.]. – Text : visual // Journal of the American Society of Nephrology. – 2008. – Vol. 20, № 5. – P. 1002-1011.

64. Adjuvant pharmacological modulation with Cytoflavin in rehabilitation at stages 2-3 in patients with acute cerebral insufficiency and post-intensive care syndrome / A.A. Belkin, N.S. Nagaev, E.A. Pinchuk [et al.]. – Text : visual // Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova. – 2025. – Vol. 125, № 3. – P. 78-85.

65. Amorphous protic ionic systems as promising active pharmaceutical ingredients: the case of the sumatriptan succinate drug / Z. Wojnarowska, J. Knapik, M. Rams-Baron [et al.]. – Text : visual // Molecular Pharmaceutics. – 2016. – Vol. 13, № 3. – P. 1111-1122.

66. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine / M.M. Kushnir, G. Komaromy-Hiller, B. Shushan [et al.]. – Text : visual //

Clinical Chemistry. – 2001. – Vol. 47. – P. 1993–2002.

67. Anzai, N. Organic anion transporter family: current knowledge / N. Anzai, Y. Kanai, H. Endou. – Text : visual // Journal of Pharmacological Sciences. – 2006. – Vol. 100, № 5. – P. 411–426.

68. Ariza, A.C. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions / A.C. Ariza, P.M. Deen, J.H. Robben. – Text : visual // Frontiers in Endocrinology. – 2012. – Vol. 3. – P. 22.

69. Arnold, P.K. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle / P.K. Arnold, L.W.S. Finley. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 2023. – Vol. 299, № 2. – P. 102838.

70. Bonaccorsi, A. Organ blood flow measured with microspheres in the unanesthetized rat: Effects of three room temperatures / A. Bonaccorsi, E. Dejana, A. Quintana. – Text : visual // Journal of Pharmacological Methods. – 1978. – Vol. 1, № 4. – P. 321-328.

71. Browne, J.L. Transfer and metabolism of citrate, succinate, α -ketoglutarate and pyruvate by hamster small intestine / J.L. Browne, P.A. Sanford, D.H. Smyth. – Text : visual // Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. – 1978. – Vol. 200, № 1139. – P. 117–135.

72. Buikin, P.A. Sumatriptan Succinate Hemi (Ethanol Solvate) / P.A. Buikin, A.V. Vologzhanina, A.A. Korlyukov. – Text : visual // Molbank. – 2024. – Vol. 2024, № 1. – P. M1766.

73. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa / A.R. Hilgers, R.A. Conradi, P.S. Burton [et al.]. – Text : visual // Pharmaceutical Research. – 1990. – Vol. 7, № 9. – P. 902-910.

74. Cellular expression of monocarboxylate transporters (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to slc5a8 / T. Iwanaga, K. Takebe, I. Kato [et al.]. – Text : visual // Biomedical Research. – 2006. – Vol. 27, № 5. – P. 243-254.

75. Cellular succinate metabolism and signaling in inflammation: implications for therapeutic intervention / H. Huang, G. Li, Y. He [et al.]. – Text : visual // Frontiers in

Immunology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1404441.

76. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease / N. Sadagopan, W. Li, S.L. Roberds [et al.]. – Text : visual // American Journal of Hypertension. – 2007. – Vol. 20. – P. 1209–1215.

77. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors / W. He, F.P. Miao, D.H. Lin [et al.]. – Text : visual // Nature. – 2004. – Vol. 429. – P. 188–193.

78. Deen, P.M.T. Succinate receptors in the kidney / P.M.T. Deen, J.H. Robben. – Text : visual // Journal of the American Society of Nephrology. – 2011. – Vol. 22, № 8. – P. 1416–1422.

79. Efficacy and tolerability of desvenlafaxine in the real-world treatment of patients with major depression: a narrative review and an expert opinion paper / G. Sampogna, F. Caraci, C. Carmassi [et al.]. – Text : visual // Expert Opinion on Pharmacotherapy. – 2023. – Vol. 24, № 14. – P. 1511-1525.

80. Elevated plasma succinate levels are linked to higher cardiovascular disease risk factors in young adults / F.J. Osuna-Prieto, B. Martinez-Tellez, L. Ortiz-Alvarez [et al.]. – Text : visual // Cardiovascular Diabetology. – 2021. – Vol. 20, № 1. – P. 151.

81. Ertugrul, B. In Vitro Inhibitory Effect of Succinic Acid on T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines / B. Ertugrul, E.S. Iplik, B. Cakmakoglu. – Text : visual // Archives of Medical Research. – 2021. – Vol. 52, № 3. – P. 270-276.

82. Ethylmethylhydroxypyridine Succinate Is an Inhibitor but Not a Substrate of ABCB1 and SLCO1B1 / A.V. Shchulkin, P.D. Erokhina, A.V. Goncharenko [et al.]. – Text : visual // Pharmaceuticals. – 2023. – Vol. 16, № 11. – P. 1529.

83. Examining P-gp efflux kinetics guided by the BDDCS – Rational selection of in vitro assay designs and mathematical models / J. Riede, K.I. Umehara, P. Schweigler [et al.]. – Text : visual // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2019. – Vol. 132. – P. 132–141.

84. Fasting upregulates the monocarboxylate transporter MCT1 at the rat blood-brain barrier through PPAR δ activation / S. Chasseigneaux, V. Cochois-Guégan, L. Lecorgne [et al.]. – Text : visual // Fluids and Barriers of the CNS. – 2024. – Vol. 21, №

1. – P. 33.

85. Fedotcheva, N.I. Nonenzymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress / N.I. Fedotcheva, A.P. Sokolov, M.N. Kondrashova. – Text : visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. – Vol. 41. – P. 56–64.

86. Fernandez-Veledo, S. Rethinking succinate: an unexpected hormone-like metabolite in energy homeostasis / S. Fernandez-Veledo, V. Ceperuelo-Mallafre, J. Vendrell. – Text : visual // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2021. – Vol. 32, № 9. – P. 680–692.

87. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis / S. Chen, N.E. Sanjana, K. Zheng [et al.]. – Text : visual // *Cell*. – 2015. – Vol. 160, № 6. – P. 1246–1260.

88. GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates / M. de Castro Fonseca, C.J. Aguiar, J.A. da Rocha Franco [et al.]. – Text : visual // *Cell Communication and Signaling*. – 2016. – Vol. 14. – P. 3.

89. Halestrap A.P. The monocarboxylate transporter family – structure and functional characterization / A.P. Halestrap. – Text : visual // *IUBMB Life*. – 2012. – Vol. 64, № 1. – P. 1–9.

90. Halestrap, A.P. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation / A.P. Halestrap, N.T. Price. – Text : visual // *Biochemical Journal*. – 1999. – Vol. 343, № 2. – P. 281-299.

91. Hems, R. Restricted permeability of rat liver for glutamate and succinate / R. Hems, M. Stubbs, H.A. Krebs. – Text : visual // *Biochemical Journal*. – 1968. – Vol. 107, № 6. – P. 807–815.

92. Hertz, L. Glucose, Lactate, β -Hydroxybutyrate, Acetate, GABA, and Succinate as Substrates for Synthesis of Glutamate and GABA in the Glutamine-Glutamate/GABA Cycle / L. Hertz, D.L. Rothman. – Text : visual // *Advances in Neurobiology*. – 2016. – Vol. 13. – P. 9–42.

93. Heterogeneity in gene loci associated with type 2 diabetes on human chromosome 20q13.1 / J.L. Bento, N.D. Palmer, M. Zhong [et al.]. – Text : visual // *Genomics*. – 2008. – Vol. 92, № 4. – P. 226–234.

94. Hodge, T. Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels / T. Hodge, M. Colombini. – Text : visual // *The Journal of Membrane Biology*. – 1997. – Vol. 157, № 3. – P. 271–279.

95. Hypoxia-inducible factor 1 in dendritic cells is crucial for the activation of protective regulatory T cells in murine colitis / K. Flück, G. Breves, J. Fandrey, S. Winning – Text : visual // *Mucosal immunology*. – 2016. – Vol. 9, № 2. – P. 379–390.

96. Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney / R. Kojima, J.-i. Kikuchi, M. Sekine [et al.]. – Text : visual // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2002. – Vol. 13, № 4. – P. 848–857.

97. Inhibition of succinate dehydrogenase activity impairs human T cell activation and function / C. Nastasi, A. Willerlev-Olsen, K. Dalhoff [et al.]. – Text : visual // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 1458.

98. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function / J. Gilissen, F. Jouret, B. Pirotte, J. Hanson. – Text : visual // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2016. – Vol. 159. – P. 56–65.

99. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS / E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude [et al.]. – Text : visual // *Nature*. – 2014. – Vol. 515, № 7527. – P. 431–435.

100. Jung Y.S. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of ¹³C-Labeled Succinic Acid after a Single Intravenous or Oral Dose in Mice / Y.S. Jung, J.S. Song, S. Ahn. – Text : visual // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 14, № 22. – P. 4757.

101. Kim K.A. Effect of metronidazole on the pharmacokinetics of fexofenadine, a P-glycoprotein substrate, in healthy male volunteers / K.A. Kim, J.Y. Park. – Text : visual // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 2010. – Vol. 66, № 7. – P. 721–725.

102. Krebs, H.A. The history of the tricarboxylic acid cycle / H.A. Krebs. – Text : visual // *Perspectives in Biology and Medicine*. – 1970. – Vol. 14. – P. 154–170.

103. Krebs, H.A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues / H.A. Krebs, W.A. Johnson. – Text : visual // *Enzymologia*. – 1937. – Vol. 4. –

P. 148–156.

104. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells / J.H. Robben, R.A. Fenton, S.L. Vargas [et al.]. – Text : visual // *Kidney International*. – 2009. – Vol. 76, № 12. – P. 1258-1967.

105. Lukyanova, L.D. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia / L.D. Lukyanova, Y.I. Kirova. – Text : visual // *Frontiers in Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 320.

106. Lungkaphin, A. Relative contribution of OAT1 and OAT3 transport activities in isolated perfused rabbit renal proximal tubules / A. Lungkaphin, B. Lewchalermwongse, V. Chatsudthipong. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*. – 2006. – Vol. 1758, № 6. – P. 789–795.

107. Mechanism of succinate efflux upon reperfusion of the ischaemic heart / H.A. Prag, A.V. Gruszczyk, M.M. Huang [et al.]. – Text : visual // *Cardiovascular Research*. – 2021. – Vol. 117, № 4. – P. 1188–1201.

108. Mechanisms underlying modulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) by somatostatin in human intestinal epithelial cells / S. Saksena, S. Theegala, N. Bansal [et al.]. – Text : visual // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2009. – Vol. 295, № 7. – P. 878-885.

109. Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease / K. Sharma, B. Karl, A.N. Mathew [et al.]. – Text : visual // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2013. – Vol. 24, № 11. – P. 1901–1912.

110. Mills, E. Succinate: a metabolic signal in inflammation / E. Mills, L.A.J. O'Neill. – Text : visual // *Trends in Cell Biology*. – 2014. – Vol. 24, № 5. – P. 313–320.

111. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate / V. Maksimovic, Z. Pavlovic-Popovic, S. Vukmirovic [et al.]. – Text : visual // *Molecular Biology Reports*. – 2020. – Vol. 47, № 6. – P. 4699–4708.

112. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) mediates succinate export in the retina / C.M. Bisbach, D.T. Hass, E.D. Thomas [et al.]. – Text : visual // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2022. – Vol. 63, № 4. – P. 1–14.

113. Nigam, S.K. The SLC22 transporter family: a paradigm for the impact of

drug transporters on metabolic pathways, signaling, and disease / S.K. Nigam. – Text : visual // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2018. – Vol. 58, № 1. – P. 663–687.

114. Organic anion transporters and their implications in pharmacotherapy / A.E. Riedmaier, A.T. Nies, E. Schaeffeler, M. Schwab. – Text : visual // *Pharmacological Reviews*. – 2012. – Vol. 64, № 3. – P. 421–449.

115. Pajor, A.M. Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters / A.M. Pajor. – Text : visual // *Pflügers Archiv*. – 2006. – Vol. 451, № 5. – P. 597–605.

116. Pajor, A.M. Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family / A.M. Pajor. – Text : visual // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. – 2014. – Vol. 466, № 1. – P. 119–130.

117. Palmieri, F. Discoveries, metabolic roles, and diseases of mitochondrial carriers: a review / F. Palmieri, M. Monné. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics*. – 2016. – Vol. 1863, № 10. – P. 2362–2378.

118. Pharmacokinetic study on the interaction between succinic acid and irbesartan in rats and its potential mechanism / Y. Wang, R. Rui, X. Zhang, B. Sun. – Text : visual // *Pharmaceutical Biology*. – 2021. – Vol. 59, № 1. – P. 1617-1620.

119. Pharmacometabolomics Approach to Explore Pharmacokinetic Variation and Clinical Characteristics of a Single Dose of Desvenlafaxine in Healthy Volunteers / A.M.R. Silveira, S. Sánchez-Vinces, A.A.R. Silva [et al.]. – Text : visual // *Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 16, № 11. – P. 1385.

120. pH-Gated succinate secretion regulates muscle remodeling in response to exercise / A. Reddy, L.H.M. Bozi, O.K. Yaghi [et al.]. – Text : visual // *Cell*. – 2020. – Vol. 183, № 1. – P. 62–75.

121. Preclinical bioavailability–bioequivalence and toxico-kinetic profile of stable succinic acid cocrystal of temozolomide / E. Sravani, M.K.C. Mannava, D. Kaur [et al.]. – Text : visual // *Current Science*. – 2015. – Vol. 108, № 6. – P. 1097-1106.

122. Prediction of basal metabolism from organ size in the rat: relationship to strain, feeding, age, and obesity / P.C. Even, V. Rolland, S. Roseau [et al.]. – Text :

visual // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. – 2001. – Vol. 280, № 6. – P. 1887-1896.

123. Preoperative circulating succinate levels as a biomarker for diabetes remission after bariatric surgery / V. Ceperuelo-Mallafré, G. Llauredó, N. Keiran [et al.]. – Text : visual // Diabetes Care. – 2019. – Vol. 42, № 10. – P. 1956–1965.

124. Quantification of fumarate and investigation of endogenous and exogenous fumarate stability in rat plasma by LC–MS/MS / Y. Shi, S. Tse, B. Rago [et al.]. – Text : visual // Bioanalysis. – 2016. – Vol. 8, № 7. – P. 661-675.

125. Regard, J.B. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression / J.B. Regard, I.T. Sato, S.R. Coughlin. – Text : visual // Cell. – 2008. – Vol. 135, № 3. – P. 561–571.

126. Retinopathy of prematurity: A review of pathophysiology and signaling pathways / M. Fevereiro-Martins, C. Marques-Neves, H. Guimarães, M. Bicho. – Text : visual // Survey of Ophthalmology. – 2023. – Vol. 68, № 2. – P. 175–210.

127. Role of succinic acid in the regulation of sepsis / H. Liu, H. Zhang, X. Zhang [et al.]. – Text : visual // International Immunopharmacology. – 2022. – Vol. 110, № 7. – P. 109065.

128. Rosenbaum, D.M. The structure and function of G-protein-coupled receptors / D.M. Rosenbaum, S.G.F. Rasmussen, B.K. Kobilka. – Text : visual // Nature. – 2009. – Vol. 459. – P. 356–363.

129. Short-term succinic acid treatment mitigates cerebellar mitochondrial OXPHOS dysfunction, neurodegeneration and ataxia in a Purkinje-specific spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) mouse model / A. Ferro, E. Carbone, J. Zhang [et al.]. – Text : visual // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12. – P. 1-20.

130. SLC26A6 and NaDC-1 transporters interact to regulate oxalate and citrate homeostasis / E. Ohana, I. Shcheynikov, O.W. Moe, S. Muallem. – Text : visual // Journal of the American Society of Nephrology. – 2013. – Vol. 24, № 10. – P. 1617–1626.

131. Srisawang, P. Modulation of succinate transport in Hep G2 cell line by PKC / P. Srisawang, A. Chatsudthipong, V. Chatsudthipong. – Text : visual // Biochimica et

Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. – 2007. – Vol. 1768, № 6. – P. 1378–1388.

132. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation / C.J. Aguiar, K.J. Alves, D.L. Ribeiro [et al.]. – Text : visual // Cell Communication and Signaling. – 2014. – Vol. 12, № 1. – P. 78.

133. Succinate causes α -SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells / Y.H. Li, S.H. Woo, D.H. Choi, E.H. Cho. – Text : visual // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2015. – Vol. 463, № 4. – P. 853-858.

134. Succinate Enhances Lipolysis and Decreases Adipocytes Size in Both Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue from High-Fat-Diet-Fed Obese Mice / T. Ji, B. Fang, M. Zhang, Y. Liu. – Text : visual // Foods. – 2023. – Vol. 12, № 23. – P. 4285.

135. Succinate independently stimulates full platelet activation via cAMP and phosphoinositide 3-kinase- β signaling / C. Högberg, O. Gidlöf, C. Tan [et al.]. – Text : visual // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2011. – Vol. 9, № 2. – P. 361–372.

136. Succinate induces aberrant mitochondrial fission in cardiomyocytes through GPR91 signaling / Y.T. Lu, L. Li, Y.L. Yang [et al.]. – Text : visual // Cell Death & Disease. – 2018. – Vol. 9, № 6. – P. 672.

137. Succinate is a paracrine signal for liver damage / P.R.A.V. Correa, E.A. Kruglov, M. Thompson [et al.]. – Text : visual // Journal of Hepatology. – 2007. – Vol. 47, № 2. – P. 262–269.

138. Succinate metabolism and its regulation of host-microbe interactions / Y.H. Wei, X. Ma, J.C. Zhao [et al.]. – Text : visual // Gut Microbes. – 2023. – Vol. 15, № 1. – P. 2190300.

139. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney / I. Toma, J.J. Kang, A. Sipos [et al.]. – Text : visual // Journal of Clinical Investigation. – 2008. – Vol. 118. – P. 2526–2534.

140. Succinate receptor GPR91, a G α i coupled receptor that increases intracellular calcium concentrations through PLC β / L. Sundström, P.J. Greasley, S. Engberg [et al.]. – Text : visual // FEBS Letters. – 2013. – Vol. 587, № 15. – P. 2399-2404.

141. Succinate receptor mediates intestinal inflammation and fibrosis / D.C.

Macias-Ceja, D. Ortiz-Masiá, P. Salvador [et al.]. – Text : visual // *Mucosal Immunology*. – 2019. – Vol. 12, № 1. – P. 178–187.

142. Succinic acid enhances sedative activity of diazepam through GABAergic receptor modulation: Evidence from behavioral approach and computational insights / M.S. Al Hasan, Y. Emon, M.Y. Alshahrani [et al.]. – Text : visual // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2025. – Vol. 399. – P. 2321-2335.

143. Succinic acid inhibits the activity of cytochrome P450 (CYP450) enzymes / H. Wang, B. Xia, M. Lin [et al.]. – Text : visual // *Pharmaceutical Biology*. – 2020. – Vol. 58, № 1. – P. 1159-1164.

144. Systemic succinate homeostasis and local succinate signaling affect blood pressure and modify risks for calcium oxalate lithogenesis / A. Khamaysi, S. Anbtawee-Jomaa, M. Fremder [et al.]. – Text : visual // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2019. – Vol. 30, № 3. – P. 381–392.

145. Targeted disruption of the SUCNR1 metabolic receptor leads to dichotomous effects on obesity / K.J. McCreath, S. Espada, B.G. Gálvez [et al.]. – Text : visual // *Diabetes*. – 2015. – Vol. 64, № 4. – P. 1154–1167.

146. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems / B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch [et al.]. – Text : visual // *Journal of Laboratory Automation*. – 2015. – Vol. 20, № 2. – P. 107–126.

147. The apoptotic efficacy of succinic acid on renal cancer cell lines / G. Kasarci, B. Ertugrul, E.S. Iplik, B. Cakmakoglu. – Text : visual // *Medical Oncology*. – 2021. – Vol. 38, № 12. – P. 144.

148. The effect of succinic acid on the metabolic profile in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance / S.J. Ives, K.S. Zaleski, C. Slocum [et al.]. – Text : visual // *Physiological Reports*. – 2020. – Vol. 8, № 21. – P. 1-13.

149. The human urine metabolome / S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal [et al.]. – Text : visual // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, № 9. – P. 73076.

150. The mitochondrial dicarboxylate carrier prevents hepatic lipotoxicity by inhibiting white adipocyte lipolysis / Y.A. An, S. Chen, Y. Deng [et al.]. – Text : visual // *Journal of Hepatology*. – 2021. – Vol. 75, № 2. – P. 387–399.

151. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis / Y. Hakak, K. Lehmann-Bruinsma, S. Phillips [et al.]. – Text : visual // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2009. – Vol. 85, № 5. – P. 837–843.

152. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis / P. Sapieha, M. Sirinyan, D. Hamel [et al.]. – Text : visual // *Nature Medicine*. – 2008. – Vol. 14. – P. 1067–1076.

153. Theoretical insights into the antiradical activity and copper-catalysed oxidative damage of mexidol in the physiological environment / N.T. Hoa, M. Van Bay, A. Mechler, Q.V. Vo. – Text : visual // *Royal Society Open Science*. – 2022. – Vol. 9, № 1. – P. 211239.

154. Transcription factors regulate GPR91-mediated expression of VEGF in hypoxia-induced retinopathy / T. Li, J. Hu, F. Gao [et al.]. – Text : visual // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 45807.

155. Tretter, L. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of α -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress / L. Tretter, V. Adam-Vizi. – Text : visual // *The Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 20, № 24. – P. 8972–8979.

156. Tretter, L. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis / L. Tretter, A. Patocs, C. Chinopoulos. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2016. – Vol. 1857, № 8. – P. 1086-1101.

157. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity / T. Rubic, G. Lametschwandtner, S. Jost [et al.]. – Text : visual // *Nature Immunology*. – 2008. – Vol. 9

158. Utilizing Monocarboxylate Transporter 1-Mediated Blood-Brain Barrier Penetration for Glioblastoma Positron Emission Tomography Imaging with 6-[18F] Fluoronicotinic Acid / P. Dilleuth, A. Ayo, T.T. Airene [et al.]. – Text : visual // *Molecular Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 22, № 8. – P. 4819-4830.

159. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions / R. Elsby, D.D. Surry, V.N. Smith, A.J. Gray. – Text : visual //

Xenobiotica. – 2008. – Vol. 38, № 7–8. – P. 1140–1164.

160. Volk C. OCTs, OATs, and OCTNs: structure and function of the polyspecific organic ion transporters of the SLC22 family / C. Volk. – Text : visual // WIREs Membrane Transport and Signaling. – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. 23–39.

161. Wang, L. Renal organic anion transporters (SLC22 family): expression, regulation, roles in toxicity, and impact on injury and disease / L. Wang, D.H. Sweet. – Text : visual // The AAPS Journal. – 2013. – Vol. 15, № 1. – P. 53–69.

162. Wang, Z. Energy metabolism in brown adipose tissue / Z. Wang, Q.A. Wang, Y. Liu, L. Jiang. – Text : visual // The FEBS Journal. – 2021. – Vol. 288. – P. 3647-3662.

163. Weerachayaphorn, J. Identification of transport pathways for citric acid cycle intermediates in the human colon carcinoma cell line, Caco-2 / J. Weerachayaphorn, A.M. Pajor. – Text : visual // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2008. – Vol. 1778, № 4. – P. 1051-1059.

164. Wettschureck, N. Mammalian G proteins and their cell type specific functions / N. Wettschureck, S. Offermanns. – Text : visual // Physiological Reviews. – 2005. – Vol. 85, № 4. – P. 1159–1204.

165. Wittenberger, T. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors / T. Wittenberger, H.C. Schaller, S. Hellebrand. – Text : visual // Journal of Molecular Biology. – 2001. – Vol. 307, № 3. – P. 799–813.