

УДК 615.9

ИЗУЧЕНИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ НЕАКТИВНОГО И ОСНОВНОГО МЕТАБОЛИТА КЛОПИДОГРЕЛА В ОРГАНАХ ОТРАВЛЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Л.С. Аносова¹, И.П. Ремезова²

¹ - ФГБОУ ВО Донецкий ГМУ им. М Горького Минздрава России, г. Донецк, ДНР, Россия

Кафедра фармацевтической и медицинской химии

² - Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ

Минздрава России, г. Пятигорск, Россия

Научный руководитель - д. м. н., проф. И. П. Ремезова

Резюме. Так как на сегодняшний день, сердечно-сосудистые заболевания занимают высокий процент смертности, препарат клопидогрел является весьма актуальным. Психоэмоциональная ситуация в мире, приводит к бесконтрольному приему данного препарата в суицидальных целях. Мы учли, что клопидогрел в организме представлен в основном метаболитами (до 90%). Одним из главных метаболитов препарата является клопидогрель карбоновая кислота. Это неактивный метаболит, который был принят в качестве «маркера» приема клопидогрела. В качестве методов анализа используются ТСХ и спектрофотометрия. Тройную LD50 бисульфата клопидогреля вводили крысам-самцам посредством внутрижелудочной инъекции. Экстракцию образовавшихся метаболитов проводили хлороформ из биоматриц погибших животных элюировали системой хлороформ-ацетоном (80:20), этанол-уксусная кислота-вода (5:3:2). Количественное определение аналита проводили с помощью метода ВЭЖХ. Наибольшие количества неактивного метаболита были определены в печени ($66,304 \pm 0,27$ мкг/г), кишечнике ($43,55 \pm 0,78$ мкг/г), моче ($71,74 \pm 0,26$ мкг/г) животных.

Ключевые слова: клопидогрел, клопидогрель карбоновая кислота, метаболит, изолирование, распределение, химико-токсикологический анализ, сердечно-сосудистые заболевания.

TO STUDY THE DISTRIBUTION OF THE INACTIVE AND MAIN METABOLITE OF CLOPIDOGREL IN THE ORGANS OF POISONED ANIMALS

Lyudmila.S. Anosova¹, Irina.P. Remezova²

¹Donetsk state Medical University named after M. Gorky (Donetsk, DPR, Russia)

²Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - branch of the Volgograd State Medical University (Pyatigorsk, Russia)

Abstract. Since today, cardiovascular diseases occupy a high percentage of mortality, the drug clopidogrel is very relevant. The psychoemotional situation in the world leads to uncontrolled use of this drug for suicidal purposes. We took into account that clopidogrel in the body is mainly represented by metabolites (up to 90%). One of the main metabolites of the drug is clopidogrel carboxylic acid. It is an inactive metabolite that has been accepted as a "marker" of clopidogrel intake. TLC and spectrophotometry are used as methods of analysis. Triple LD50 of clopidogrel bisulfate was administered to male rats by intragastric injection. The extraction of the formed metabolites was carried out by chloroform from the biomatrices of dead animals eluted by the chloroform-acetone system (80:20), ethanol-acetic acid-water (5:3:2). Quantitative determination of the analyte was carried out using the HPLC method. The largest amounts of inactive metabolite were determined in the liver ($66,304 \pm 0.27$ mcg/g), intestines (43.55 ± 0.78 mcg/g), urine (71.74 ± 0.26 mcg/g) of animals.

Keywords: clopidogrel, clopidogrel carboxylic acid, metabolite, isolation, distribution, chemical and toxicological analysis, cardiovascular diseases.

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) играют центральную роль среди хронических неинфекционных состояний. Анализ данных за период 2002-2022 годов указывает на возрастание распространенности таких состояний, включающих ишемическую болезнь сердца (ИБС), артериальную гипертензию и цереброваскулярные заболевания [1]. Показатели заболеваемости в Российской Федерации (РФ) при ССЗ, в том числе по болезням, характеризующимся повышением артериального давления, ИБС и ЦВЗ имеют стойкую динамику увеличения, это свидетельствует о значительном росте обращений граждан в лечебные учреждения [1].

За последние 20 лет были достигнуты значительные успехи в антитромбоцитарной фармакотерапии, особенно для лечения пациентов с ишемической болезнью сердца [2]. Длительное применение антиагрегантов - один из действенных способов предотвращения неблагоприятных последствий при патологии ССЗ [3,4], основа лечения и вторичной профилактики ССЗ (острый коронарный синдром, транзиторная ишемическая атака, инсульт, заболевания периферических сосудов) [2].

В комплексном лечении ССЗ активно применяют антитромбоцитарные средства, эффективность которых проверена с позиции доказательной медицины: среди основных групп лекарственных препаратов для лечения патологии сердечно-сосудистой системы особое место занимает клопидогрел [3, 5, 6].

Также известно, что клопидогрел является пролекарством, и для его активации, необходимо работа CYP [7]. Такие лекарственные препараты как варфарин, кетоконазол [7],

эритромицин, препараты сульфанилмочевины при взаимодействии с клопидогрелом могут привести к лекарственному взаимодействию, то есть к снижению активности фермента CYP и накоплению клопидогрела в организме, вследствие чего может развиваться хроническое отравление клопидогрелом [8,9]. Мы учли, что клопидогрель при попадании в организм метаболизируется до неактивного и основного метаболита клопидогрель карбоновой кислоты (до 90%) (рис.1) [9]. Клопидогрель, как и близкие к нему структуры, токсичны для организма человека [7]. Из-за общетоксического действия, клопидогреля бисульфат в Российской Федерации отнесли к вредным веществам [10].

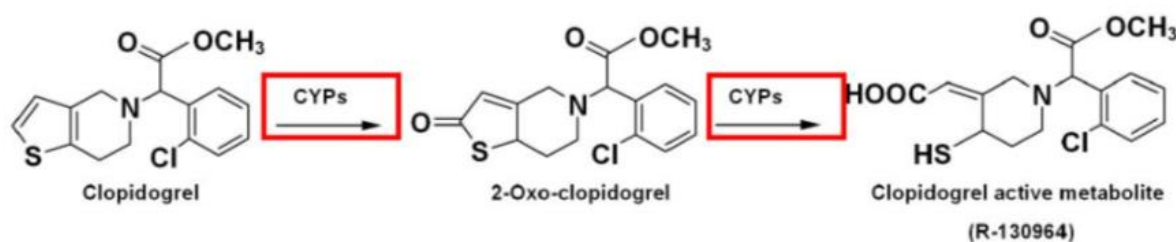


Рисунок 1. Схема метаболизма клопидогрела

Обращает на себя внимание и тот факт, что клопидогрель карбоновая кислота является также основной примесью клопидогрела при изготовлении лекарственного препарата и строго контролируется [11].

Сегодня клопидогрель очень часто используется с целью самоубийства. Авторами Коцабей Г, Окгуляр И, Аккая В, Гулер К.в 2006 году сообщалось о случае 49-летнего мужчины, принявшего передозировку 1650 мг клопидогреля с суицидальными намерениями. У пациента наблюдались аномалии агрегации тромбоцитов [10, 12].

Поэтому, нами было принято решение использовать клопидогрель карбоновую кислоту в качестве «маркера» употребления препарата клопидогрел.

Целью исследований было изучение распределения клопидогрель карбоновой кислоты в органах отравленных животных.

Материалы и методы

Исследования с использованием лабораторных животных проводились в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), Директивой Совета Европы 2010/63/EU и в соответствии с принципами биоэтики.

Для экспериментов были отобраны крысы-самцы массой 190-200 г и возрастом 2-3 месяца. Животных выращивали в соответствии с санитарно-гигиеническими нормами в виварии Донецкого государственного медицинского университета им. М.Горького.

Были сформированы четыре опытные и две контрольные группы (по пять животных в каждой). Животные опытных групп получали клопидогрел в дозах, эквивалентных терапевтической и максимальной разовой дозе [7, 10].

Клопидогрель был введен однократно животным через зонд в форме водного раствора, который готовился путем растворения таблеток Плавикс (25 мг, Pfizer, Франция) в воде. После введения препарата, животным был предоставлен свободный доступ к пище и воде. В контрольных группах животные не получали данного препарата.

Исследование проводилось в два этапа - через 3 часа и через 24 часа после введения соответствующей дозы препаратов. Животных, которым вводили препараты, подвергали декапитации при наличии эфирного наркоза. Для изучения выбирали мозг, сердце, легкие, печень, желудок, кишечник, кровь и мочу. Собирать мочу животных начинали сразу после введения препаратов и продолжали в течение 3 и 24 часов. Контрольные группы также подвергались отбору тех же биологических жидкостей и органов.

Каждый орган был взвешен, а объем биологических жидкостей измерен. При необходимости, биологический материал мы хранили при температуре -20°C . Для изолирования клопидогрель карбоновой кислоты из органов, использовался метод с использованием хлороформа [13]. Для изолирования метаболита клопидогреля из проб мочи, собранных после введения препарата в течение 3 и 24 часов, применялась разработанная методика [14]. Во всех случаях, для изолирования лекарственного метаболита, использовался растворитель в десятикратном объеме относительно массы органа.

Для выявления метаболита клопидогреля – клопидогрель карбоновой кислоты в образцах органов и биологических жидкостей крыс, взятых для исследования через 3 и 24 часа, использовался метод ТСХ [15]. Для количественного определения клопидогреля в образцах органов и биологических жидкостей крыс, взятых для исследования через 3 и 24 часа, применялся ВЭЖХ-метод [16].

Результаты и их обсуждения

При идентификации методом ТСХ хроматограммы было обнаружено, что при проявлении пластинок в УФ-свете с длиной волны 278 нм метаболит клопидогреля флуоресцирует зеленым цветом. После обработки реактивом Драгендорфа пятно метаболита окрашивается в коричневый цвет. Результаты показали, что наилучшее разделение между метаболитами достигается при использовании системы растворителей хлороформ-ацетон в соотношении 80:20, в соответствии с рекомендациями ТИАФТ. Затем был проведен ТСХ-анализ в подтверждающей системе растворителей, состоящей из этанола, концентрированной уксусной кислоты и воды в соотношении 5:3:2.

В таблице 1 представлены значения Rf метаболита клопидогрела – клопидогрель карбоновой кислоты, определенные с помощью метода ТСХ в органах и биологических жидкостях крыс, взятых для исследования через 24 часа после получения однократной терапевтической дозы. Анализ проводился с использованием растворителей хлороформ-ацетон (80:20) и этанол-кислота ацетатная концентрированная-вода (5:3:2).

Таблица 1

Значение величины Rf клопидогрель карбоновой кислоты, обнаруженной в тканях и биологических жидкостях крыс (через 24 ч после введения однократной терапевтической дозы)

Исследуемый орган или биологическая жидкость	Система растворителей	Rf		
		Пластинка „Sorbfil”	ВЭТСХ	Alugram Sil G/UV254
Легкие	Хлороформ-ацетон (80:20)	0,33	0,53	0,55
	Этанол- уксусная кислота – вода (5:3:2)	0,66	0,72	0,68
Печень	Хлороформ-ацетон (80:20)	0,32	0,54	0,57
	Этанол- уксусная кислота – вода (5:3:2)	0,67	0,7	0,68
Желудок	Хлороформ-ацетон (80:20)	0,31	0,70	0,70
	Этанол- уксусная кислота – вода (5:3:2)	0,66	0,68	0,67
Кишечник	Хлороформ-ацетон (80:20)	0,31	0,54	0,56
	Этанол- уксусная кислота – вода (5:3:2)	0,66	0,69	0,69
Моча	Хлороформ-ацетон (80:20)	0,33	0,55	0,57
	Этанол- уксусная кислота – вода (5:3:2)	0,67	0,71	0,69

Результаты ТСХ-скрининга показали, что после применения однократной терапевтической дозы клопидогрела метаболит этого препарата был обнаружен в биологическом материале, взятом у животных для исследования через 3 часа. Клопидогрел карбоновая кислота была обнаружен в сыворотке крови, печени и моче.

В контрольной группе извлеченные из тканей и содержимого желудка, тонкого и толстого кишечника образцы не содержали в себе следы препарата клопидогрел или других веществ, схожих по структуре.

В биологической пробе, полученной через 24 часа после ввода животным однократной дозы препарата метаболиты клопидогрела -клопидогрель карбоновая кислота была обнаружена в крови, желчном пузыре, моче и кишечнике.

В образцах крови, взятых через 24 часа после однократного введения одной разовой дозы препарата Клопидогрела, карбоновая кислота не выявлена.

Количество клопидогрела в крови определяли путем суммирования количества препарата, указанных в эритроцитарной массе и плазме крови. Результаты количества определения клопидогрела по его неактивному метаболиту- клопидогрель карбоновой кислоте приведены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты количественного определения клопидогрела в органах крыс, отобранных через 24 ч после введения препарата в высшей разовой дозе (n=5) по его неактивному метаболиту клопидогрель карбоновой кислоте

Орган	Масса органа, г (мл)	Определено метаболита клопидогрель карбоновой кислоты во взятом объекте, мкг	Определено клопидогрела	
			Во взятом объекте, мкг	В пересчете на 1 г (1 мл) объекта, мкг
Мозг	1,3±0,79	0,344	0,43	0,33
Сердце	0,83±0,11	0,28	0,35	0,42
Легкие	2,07±0,55	0,448	0,56	0,27
Печень	6,96±1,15	66,304	82,88	10,92
Желудок с содержимым	2,03±0,49	4,69	5,86	2,88
Кишечник	9,04±2,04	43,55	54,43	6,02
Кровь	5,10±1,3	24,9	31,13	5,10
Моча	13,44±3,63	71,74	89,68	6,67

Приведенный рисунок 2 демонстрирует соотношение между общим количеством препарата, подвергнувшегося исследованию, и его структурным метаболитом в образцах органов и биологических жидкостях крыс. Пробы были отобраны для исследования через 24 часа после введения максимальной разовой дозы препарата.

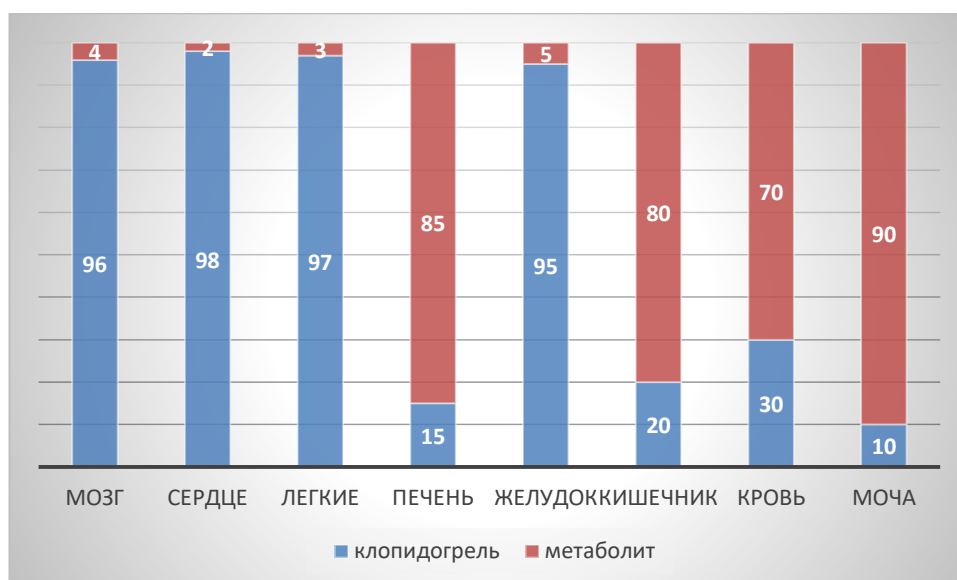


Рисунок 2. Соотношение между уровнем концентрации препарата и его неактивного основного метаболита, взятых на анализ через 24 часа после введения клопидогрела

Таким образом, наибольшие количества неактивного метаболита были определены в печени ($66,304 \pm 0,27$ мкг/г), кишечнике ($43,55 \pm 0,78$ мкг/г), моче ($71,74 \pm 0,26$ мкг/г) животных.

Как показывают проведенные исследования, то через 24 часа после принятой терапевтической дозы клопидогрела, в желудке можно наблюдать в основном сам лекарственный препарат. Метаболит клопидогрела присутствует только как примесь А. Но идентифицировать метаболит данного препарата можно в печени, кишечнике, крови и моче, где доля определяемого метаболита составляет практически 80-90%.

Полученные данные указывают на необходимость получения анализа крови (сыворотки) для клинических лабораторных исследований в первые три часа после приема клопидогрела. По отношению к судебно-химическому анализу при случаях смерти от отравления клопидогрелом, рекомендуется исследование содержимого желудка, кишечника, печени и мочи.

Заключение

Таким образом, по неактивному основному метаболиту клопидогрель карбоновой кислоте можно определить как количественное содержание препарата в крови, так и доказать факт употребления клопидогрела. Данная информация может применяться в судебной медицине для химико-токсикологического анализа.

Литература

1. Бичурин Д.Р. СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ. РЕГИОНАЛЬНЫЙ АСПЕКТ / Д.Р. Бичурин, О.В. Атмайкина, О.А. Черепанова // Международный научно-исследовательский журнал. — 2023. — №8 (134). — URL: <https://research->

- journal.org/archive/8-134-2023-august/10.23670/IRJ.2023.134.103 (дата обращения: 24.10.2023). — DOI: 10.23670/IRJ.2023.134.103
2. Мамедов Н. М. Преимущества клопидогрела во вторичной профилактике ишемической болезни сердца: от механизма действия до клинических исследований. *Лечебное дело*. 2017. № 2. С. 74–78.
 3. Явелов И. С. Место клопидогрела в современном лечении острого коронарного синдрома. *Atherothrombosis, specialized medical journal*. 2020. № 1. Р. 72–81. DOI: <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2020-1-72-81>.
 4. Effect of Clopidogrel on Thrombus Formation in an Ex Vivo Parallel Plate Flow Chamber Model Cannot Be Reversed by Addition of Platelet Concentrates or vWF Concentrate / J. Kira et al. *Anesthesia & Analgesia*. 2017. Vol. 124, № 4. P. 1091–1098.
 5. Patti G., Micieli G., Cimminiello C., Bolognese L. The Role of Clopidogrel in 2020: A Reappraisal. *Cardiovasc. Ther.* 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8703627> (Date of access: 12.06.2023).
 6. Пучиньян Н.Ф., Фурман Н.В., Малинова Л.И., Долотовская П.В. Проблема контроля эффективности антитромбоцитарной терапии в кардиологической практике. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии* 2017;13(1): 107-115. DOI: <http://dx.doi.org/10.20996/1819-6446-2017-13-1-107-115>.
 7. Hobson A. R., Qureshi Z., Banks P., Curzen N. Gender and responses to aspirin and clopidogrel: insights using short thrombelastography. *Cardiovasc. Ther.* 2019. № 27. P. 246–252. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2009.00106.x> (Date of access: 12.06.2023).
 8. Zhou S.-F., Liu J.-P., Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab. Rev.* 2019. № 41. P. 89–295. DOI: <https://doi.org/10.1080/03602530902843483> (Date of access: 12.06.2023).
 9. Аносова Л.С. Разработка условий аналитической диагностики отравлений клопидогрелом. *Фармация*, 2022; 71 (6): 12–18. <https://doi.org/10.29296/25419218-2022-06-02>
 10. Аносова Л.С. Распределение клопидогрела в органах отравленных животных. *Фармация*, 2021; 70 (6): 31-36 <https://doi.org/10.29296/25419218-2021-06-06>.
 11. Государственная Фармакопея Российской Федерации, XIV изд., том II, ОФС «Клопидогрела сульфат. Таблетки». [Электронное издание]. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14>. [Дата обращения 12 сентября, 2023].

12. Meta-analysis of clopidogrel pretreatment in acute coronary syndrome patients undergoing invasive strategy / R. Nairooz et al. *International Journal of Cardiology*. 2017. Vol. 229, № 15. P. 82–89.
13. Аносова Л.С. Изолирование клопидогреля с биологического материала с помощью хлороформа. Материалы V Всероссийской научно-практической конференции «Наука и образование: актуальные исследования и разработки». г. Чита, 2022. С. 19-24.
14. Изолирование клопидогреля и его метаболита из биологических жидкостей / В. С. Бондарь, Л. С. Аносова, З. В. Шовковая // *Фармация Казахстана*. – 2013. – №9. – С. 59 – 60.
15. Аносова Л.С., Агафонов А.М., Ремезова И.П. Разработка метода ТСХ-скрининга антитромбоцитарных препаратов: клопидогреля и ацетилсалициловой кислоты для целей химико-токсикологического анализа. Материалы IX Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств», посвященной 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете. Г. Воронеж, 2023. С.155-162. DOI: 10.17308/978-5-9273-3827-6-2023-157-162.
16. Аносова Л.С., Ремезова И.П. Анализ метаболита клопидогреля – клопидогрель карбоновой кислоты методом ВЭЖХ. Научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященная 50-летию кафедры токсикологической химии. г. Пермь, 2022. С.12-17.