

А.С. Малыгин¹, Н.С. Попов², М.А. Демидова²

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ВАЛЬПРАЗОЛАМИДА

¹Кафедра фармакологии, клинической фармакологии
ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинской университет Минздрава России,
²Кафедра управления и экономики фармации с курсами фармакогнозии,
фармацевтической технологии, фармацевтической и токсикологической химии
ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинской университет Минздрава России

В экспериментах на кроликах исследованы особенности метаболизма вальпрозоламида – нового противоэпилептического средства из группы вальпроатов. Определение содержания вальпрозоламида и его метаболитов в плазме крови и моче кроликов осуществляли хромато-масс-спектрометрическим методом. Масс-спектрометрическую идентификацию вальпрозоламида, его глюкуронида и фосфата осуществляли при положительной поляризации по значению MRM переходов: m/z 256,1 → m/z 130,1 и m/z 81,0; m/z 432,2 → m/z 129,1; m/z 336,1 → m/z 129,2 соответственно. Показано, что в организме вальпрозоламид практически полностью метаболизируется, выводится в неизменном виде с мочой в среднем 0,05% исследуемого лекарственного средства. Основным направлением метаболизма является его конъюгация с глюкуроновой и фосфорной кислотами.

Ключевые слова: хромато-масс-спектрометрия, вальпроаты, противоэпилептические средства, метаболизм.

EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF METABOLISM FEATURES OF VALPRAZOLAMIDE

A.S. Malygin, N.S. Popov, M.A. Demidova

Tver State Medical University

In rabbit experiments, the metabolism of valprozalamide, a new antiepileptic agent from the valproate group, has been studied. The content of valprozalamide and its metabolites in blood plasma and urine of rabbits was determined by chromatography-mass spectrometry. Mass-spectrometric identification of valprozalamide, its glucuronide and phosphate was carried out with positive polarization according to the value of MRM transitions: m/z 256.1 → m/z 130.1 and m/z 81.0; m/z 432.2 → m/z 129.1; m/z 336.1 → m/z 129.2, respectively. It is shown that in the body valprozalamide is almost completely metabolized, in an unchanged form with urine output average 0.05%. The main direction of metabolism is its conjugation with glucuronic and phosphoric acids.

Key words: chromatography-mass spectrometry, valproates, antiepileptics, metabolism.

Введение

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных и социально значимых неврологических заболеваний, требующих длительной и нередко пожизненной фармакотерапии для надежного контроля за развитием судорожных припадков. В настоящее время в лечении эпилепсии и других заболеваний центральной нервной системы, сопровождающихся эпилептическим синдромом, используют широкий арсенал основных (вальпроаты, карбамазепин, фенитоин, топирамат, леветирацетам) и дополнительных противоэпилептических средств (ретигабин, перампанел, лакосамид и др.). Наиболее часто назначаемыми антиконвульсантами являются вальпроаты, которые получают около 80% пациентов, страдающих эпилепсией различных форм (большие и малые приступы, миоклоническая, тонико-клоническая и биполярная формы, эпилептический синдром) [1,2]. Вальпроевая кислота в организме практически полностью метаболизируется. В неизменном виде через почки с мочой ее выделяется менее 5%. Основ-

ными направлениями метаболических превращений вальпроатов является конъюгация с глюкуроновой кислотой (до 50%), β-окисление жирных кислот в митохондриях (до 40%) и внемитохондриальное β-окисление при участии цитохрома P450 (до 10%) [3,4]. В механизме токсического действия вальпроатов особое значение имеют метаболиты, прежде всего продукты β-окисления жирных кислот, в том числе 2-пропил-4-пентеновая (4-en-VPA) и другие непредельные кислоты. Интенсивность и направленность процессов окисления вальпроевой кислоты во многом зависят от генетически детерминированной активности ферментов системы цитохромов (СYP) [5,6], что делает актуальным изучение особенностей метаболизма вальпроевой кислоты и ее производных.

Новым противоэпилептическим средством из группы амидных производных вальпроевой кислоты является вальпрозоламид. В экспериментах на животных с использованием различных моделей эпилепсии вальпрозоламид продемонстрировал вы-

сокую противозипилептическую активность в сочетании с низкой токсичностью.

Цель настоящего исследования – определить основные направления метаболизма вальпрозоламида в экспериментах на кроликах.

Материалы и методы

Исследование особенностей метаболизма вальпрозоламида проводили в экспериментах на 6 кроликах-самцах породы шиншилла массой 3,62±0,15 кг. Все эксперименты с животными осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств [8] с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Directive 2010/63/EU) при наличии разрешения этического комитета Тверского государственного медицинского университета.

Вальпрозоламид вводили подопытным кроликам внутривенно в дозе 1 мг/кг в 0,33% растворе димексида или внутривенно в дозе 1 мг/кг в 20 мл 2% слизи крахмала. Период вымывания исследуемого вальпроата между этапами составлял 7 дней. Продолжительность мониторинга концентрации вальпрозоламида в плазме крови в среднем в 5 раз превышала период полувыведения ($T_{1/2}$). Забор крови осуществляли через катетер из краевой вены уха кроликов в обработанные натриевой солью гепарина пробирки в объеме 0,5 мл до начала исследования и через 0,016; 0,08; 0,16; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 36 и 48 часов после введения вальпрозоламида. Для получения плазмы кровь центрифугировали в течение 10 минут при скорости 3000 оборотов в минуту.

Для оценки почечной экскреции вальпрозоламида у всех подопытных кроликов проводили сбор суточной мочи и определение ее объема.

Пробоподготовку биологических объектов осуществляли методом осаждения белков ацетонитрилом. Для этого к 200 мкл исследуемого образца добавляли 800 мкл ацетонитрила. Пробу встряхивали на вортекс-шейкере в течение 30 секунд, термостатировали 20 минут при температуре 37 °С, далее центрифугировали в течение 10 минут при 18 000 об./мин, надосадочную жидкость использовали для исследования.

Определение вальпрозоламида и его метаболитов в плазме крови и моче подопытных кроликов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС). Разработанная методика была валидирована по параметрам селективности, кросс-переносу, линейности, точности, прецизионности, стабильности в соответствии с отечественными и международными требованиями [9]. Для хроматографии использовали хроматограф Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, ФРГ). Масс-спектрометрию осуществляли с помощью тройного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex QTrap 3200 MD

(AB Sciex, Сингапур) с электрораспылительным источником ионов (Turbo V с зондом TurboIonSpray).

Для анализа биологических образцов применяли следующие условия хроматографирования: неподвижная фаза – аналитическая колонка Phenomenex Synergi C18 4 мкм 2,0×50 мм при температуре 40 °С; подвижная фаза – смесь ацетонитрила и воды деионизированной со следующим профилем градиента: 0–1-я минута – 10% водный раствор ацетонитрила; 1–3-я минуты – линейное повышение концентрации ацетонитрила в смеси до 90%; 3–4-я минуты – изократический участок с концентрацией ацетонитрила 90%; 4–5-я минуты – кондиционирование колонки 10% раствором; скорость потока подвижной фазы – 0,6 мл/мин; объем вводимой пробы – 20 мкл; общее время градиентного элюирования – 5 минут. Детекцию вальпрозоламида и его метаболитов (глюкуронида и фосфата) осуществляли масс-спектрометрически в режиме сканирования положительно заряженных ионов. Значения MRM-переходов вальпрозоламида, его глюкуронида и фосфата составили соответственно: m/z 256,1 → m/z 130,1 и m/z 81,0; m/z 432,2 → m/z 129,2; m/z 336,0 → m/z 129,2.

В связи с тем, что вальпрозоламид является амидным производным вальпроатов, для оценки его метаболитических превращений во всех биологических образцах проводили определение вальпроовой кислоты и продуктов ее окисления (2-пропил-4-пентеновой, 3-гидрокси-2-пропилпентановой, 4-гидрокси-2-пропилпентановой, 2-пропилпентандиовой и 3-оксо-2-пропилпентановой кислот) с помощью хромато-масс-спектрометрической методики [10, 11, 12]. Идентификацию вальпроовой кислоты в плазме крови и моче подопытных животных осуществляли при отрицательной поляризации в режиме регистрации множественных ионов (ММ) по значению m/z 143,1. Определение 2-пропил-4-пентеновой, 3-гидрокси-2-пропилпентановой, 4-гидрокси-2-пропилпентановой, 2-пропилпентандиовой и 3-оксо-2-пропилпентановой кислот осуществляли при отрицательной поляризации по значению MRM-переходов: m/z 140,1 → 140,1; m/z 159,1 → 101; m/z 159,1 → 123,1; m/z 173 → 129,1; 157,05 → 113 соответственно.

По результатам количественного определения вальпрозоламида в плазме крови подопытных кроликов рассчитывали значения следующих фармакокинетических параметров: нулевую (C_0) концентрацию вальпрозоламида после внутривенного введения, максимальную концентрацию (C_{max}) и время ее достижения (t_{max}) после однократного внутривенного введения, период полувыведения ($T_{1/2}$), константу элиминации (kel), клиренс (Cl), время удерживания в плазме (MRT), значения площадей под фармакокинетической кривой $AUC_0 \rightarrow \infty$ (от момента введения исследуемого соединения до бесконечности) и $AUC_0 \rightarrow 48$ (от момента введения исследуемого соединения до 48 ч) для внутривенного и внутривенного введения и абсолютную биодоступность.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения AnalystSoft Inc.,

BioStat – 2009. Для каждого фармакокинетического параметра определяли среднее арифметическое (Mean), среднее геометрическое (Gmean), стандартное отклонение (SD), значение коэффициента вариации (CV,%) и медианы (Median), доверительный интервал (L – 95%; Up – 95%).

Результаты и обсуждение

Анализ результатов проведенного экспериментального исследования показал, что после однократного внутрижелудочного введения вальпрозоламида (1 мг/кг) его максимальное содержание в плазме крови подопытных кроликов наблюдалось через 1,76 ч (95% ДИ: 1,59–1,93) и составляло 2564 нг/мл (95% ДИ: 2404–2724), что было в среднем в 7 раз ($p < 0,05$) меньше, чем его нулевая концентрация (C_0) при внутривенном введении (табл. 1).

Таблица 1

Значения нулевой концентрации вальпрозоламида (C_0) в плазме крови кроликов после внутривенного введения (1 мг/кг), максимальной концентрации (C_{max}) и времени (t_{max}) ее достижения после внутрижелудочного введения (1 мг/кг)

Показатель	Внутривенное введение	Внутрижелудочное введение	
	C_0 , нг/мл	C_{max} , нг/мл	t_{max} , ч
Mean	18 007	2564	1,76
Gmean	17 995	2562	1,75
SD	712,9	96,2	0,18
CV, %	3,96	3,75	10,7
Median	17 920	2567	1,75
Min	17 200	2450	1,55
Max	19 300	2710	2,03
Доверительный интервал (L – 95%; Up – 95%)	17 437–18 577	2404–2724	1,59–1,93

После внутрижелудочного введения вальпрозоламида в течение 2 часов отмечалось увеличение его концентрации в плазме крови (фаза всасывания), а затем постепенное снижение (фаза распределения и элиминации). Через 48 часов наблюдения концентрация вальпрозоламида в плазме крови приближалась к нижнему пределу количественного определения. Зависимость концентрации исследуемого лекарственного средства в плазме крови от времени представлена на рис. 1.

При внутривенном введении исследуемого лекарственного средства отмечали 2-фазный характер снижения его концентрации в плазме крови подопытных животных. Вначале в течение 45 минут наблюдалось быстрое уменьшение концентрации, что, вероятно, связано с перераспределением в ткани (α -фаза, или фаза распределения). В дальнейшем отмечалось медленное снижение содержания вальпрозоламида в плазме крови (β -фаза). В связи с наличием 2-линейных участков снижения концентрации вальпрозоламида в соответствии с двухкамерной моделью рассчитывали его содержание в центральной (кровь, интерстициальные ткани) и периферической (ткани внутренних органов) камерах. Фармакокинетические кривые концентрация–время, характеризующие изменения содержания вальпрозоламида в крови и тканях после внутривенного введения, представлены на рис. 2.

Проведенные по результатам исследования расчеты позволили определить, что значение $T_{1/2}$ при внутрижелудочном введении вальпрозоламида составило 7,67 (95% ДИ: 7,15–8,19), время удерживания вещества в плазме – 8,91 ч (95% ДИ: 8,19–9,63), kel – 0,105 ч⁻¹ (95% ДИ: 0,101–0,108), Cl – 2,67 л/ч/кг (95% ДИ: 2,58–2,76). Период полувыведения при внутривенном введении вальпрозоламида был равен 8,22 ч (95% ДИ: 7,27–9,17), что достоверно не отличалось от его значения при внутрижелудочном применении.

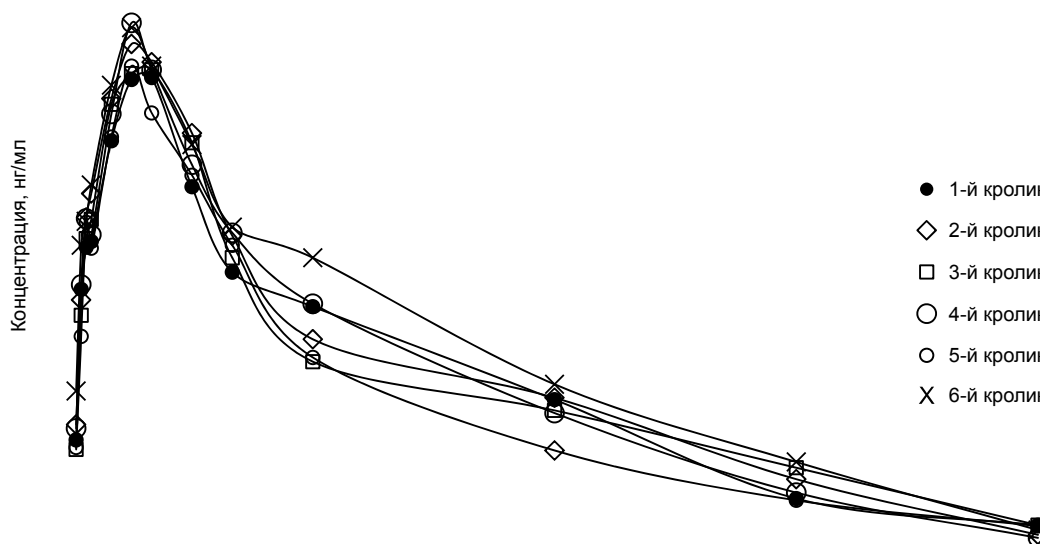


Рис. 1. Зависимость концентрации вальпрозоламида в плазме крови кроликов от времени после однократного внутрижелудочного введения (1 мг/кг)

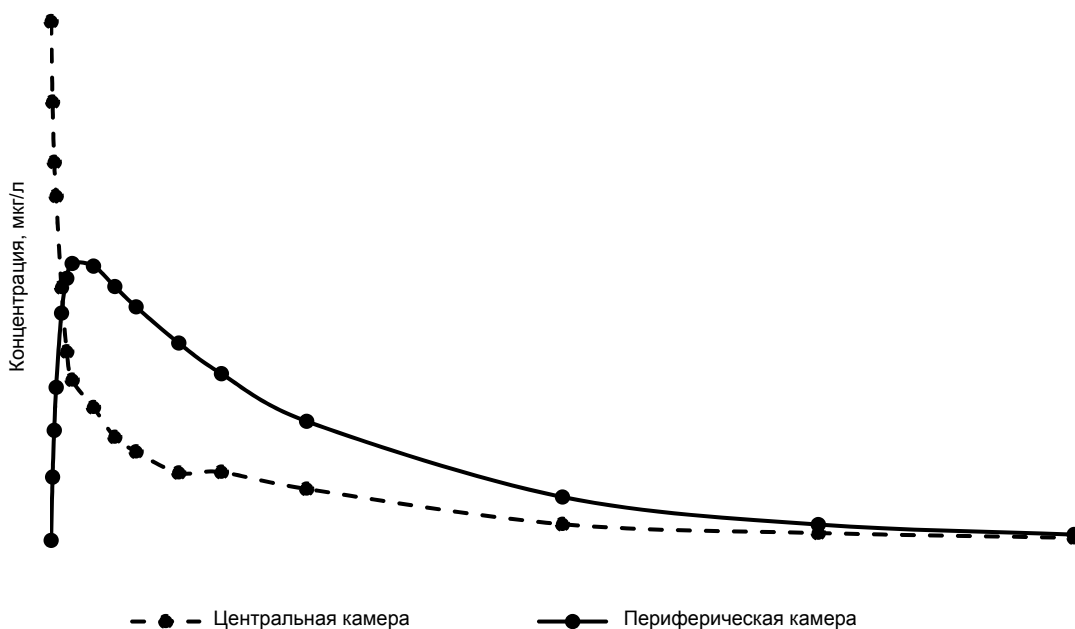


Рис. 2. Зависимость концентрации вальпрозоламида от времени в центральной и периферической камерах после однократного внутривенного введения (1 мг/кг)

Полученные данные свидетельствуют, что вальпрозоламид, обладая высокой липофильностью, хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта, интенсивно проникает из кровеносного русла в периферические ткани и длительно в них удерживается.

Для определения абсолютной биодоступности вальпрозоламида при применении внутрь были рассчитаны площади под фармакокинетической кривой ($AUC_{0 \rightarrow 48}$ и $AUC_{0 \rightarrow \infty}$) для внутрижелудочного и внутривенного введения (табл. 2).

Таблица 2

Значения площадей под фармакокинетической кривой ($AUC_{0 \rightarrow 48}$ и $AUC_{0 \rightarrow \infty}$) при внутрижелудочном и внутривенном введении вальпрозоламида в дозе 1 мг/кг

Показатель	Внутрижелудочное введение		Внутривенное введение	
	$AUC_{0 \rightarrow 48}$, нг×ч/мл	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, нг×ч/мл	$AUC_{0 \rightarrow 48}$, нг×ч/мл	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, нг×ч/мл
Mean	38 549	39 104	45 397	46 428
Gmean	38 463	39 026	45 357	46 386
SD	2848	2720	2110	2186
CV, %	7,4	6,9	4,7	4,7
Median	38 291	38 849	44 630	45 764
Min	34 807	35 521	43 161	44 266
Max	42 956	43 486	48 836	50 102
Доверительный интервал (L – 95%; Up – 95%)	36 270–40 828	36 928–41 280	43 709–47 085	44 679–48 177

Сравнение площадей под фармакокинетическими кривыми для внутрижелудочного и внутривенного введения показало, что абсолютная биодоступность

вальпрозоламида при приеме внутрь составила 85,3%.

Во все временные интервалы после введения вальпрозоламида в каждом образце плазмы крови проводили определение вальпрооевой кислоты и продуктов ее окисления. Отмечено, что ни в одной из исследованных проб крови вальпрооевой кислоты и ее метаболитов (2-пропил-4-пентеновой, 3-гидрокси-2-пропилпентановой, 4-гидрокси-2-пропилпентановой, 2-пропилпентандиовой и 3-оксо-2-пропилпентановой кислот) обнаружено не было. Полученные данные свидетельствуют о том, что вальпрозоламид в организме не метаболизируется до вальпрооевой кислоты и не образует токсичных продуктов ее окисления.

Методом хромато-масс-спектрометрии в плазме крови подопытных кроликов, получавших исследуемое производное вальпрооевой кислоты, были обнаружены продукты конъюгации вальпрозоламида с глюкуроновой и фосфорной кислотами. Идентификацию основных метаболитов вальпрозоламида осуществляли в режиме сканирования положительно заряженных ионов. Было выявлено, что значение MRM-переходов глюкуронида и фосфата составили соответственно: m/z 81,0; m/z 432,2 \rightarrow m/z 129,2; m/z 336,0 \rightarrow m/z 129,2. Масс-спектры 2-го порядка для глюкуронида и фосфата вальпрозоламида представлены на рис. 3 и 4.

На следующем этапе экспериментального исследования осуществляли определение вальпрозоламида, вальпрооевой кислоты и их метаболитов в моче подопытных кроликов.

Было выявлено, что средний суточный объем мочи у подопытных кроликов составил 206 ± 21 мл, моча имела светло-желтую окраску, значение pH составило $7,4 \pm 0,1$ ед. (слабощелочная близко к ней-

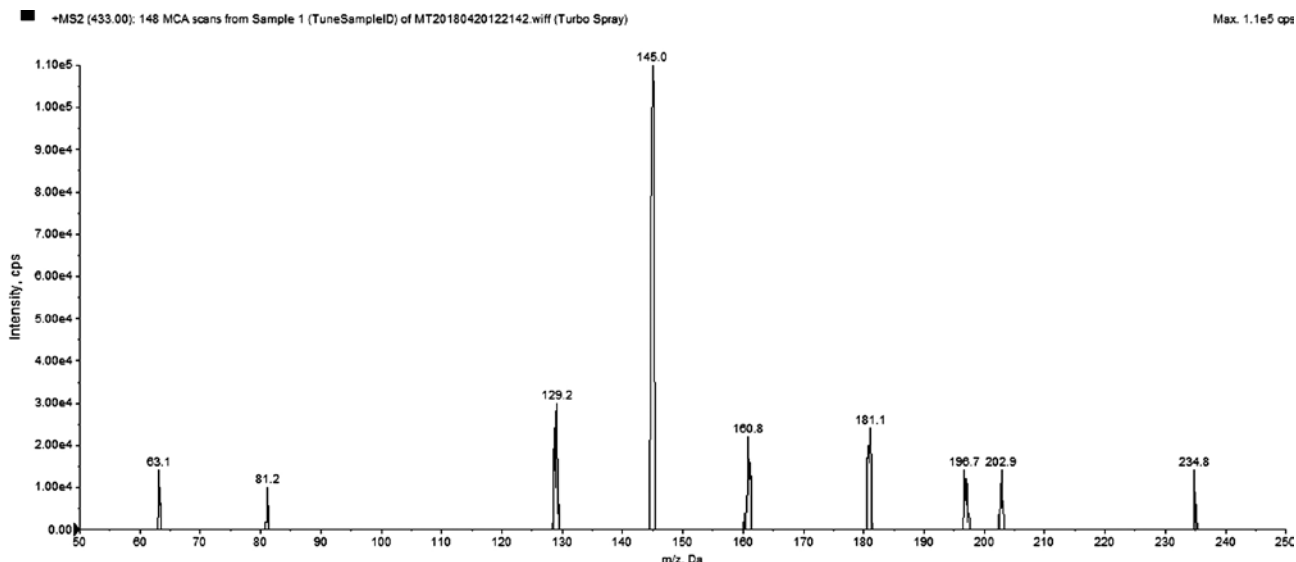


Рис. 3. Масс-спектр глюкуронида вальпрозоламида 2-го порядка (в режиме сканирования положительно заряженных ионов, для иона-предшественника m/z 432,2)

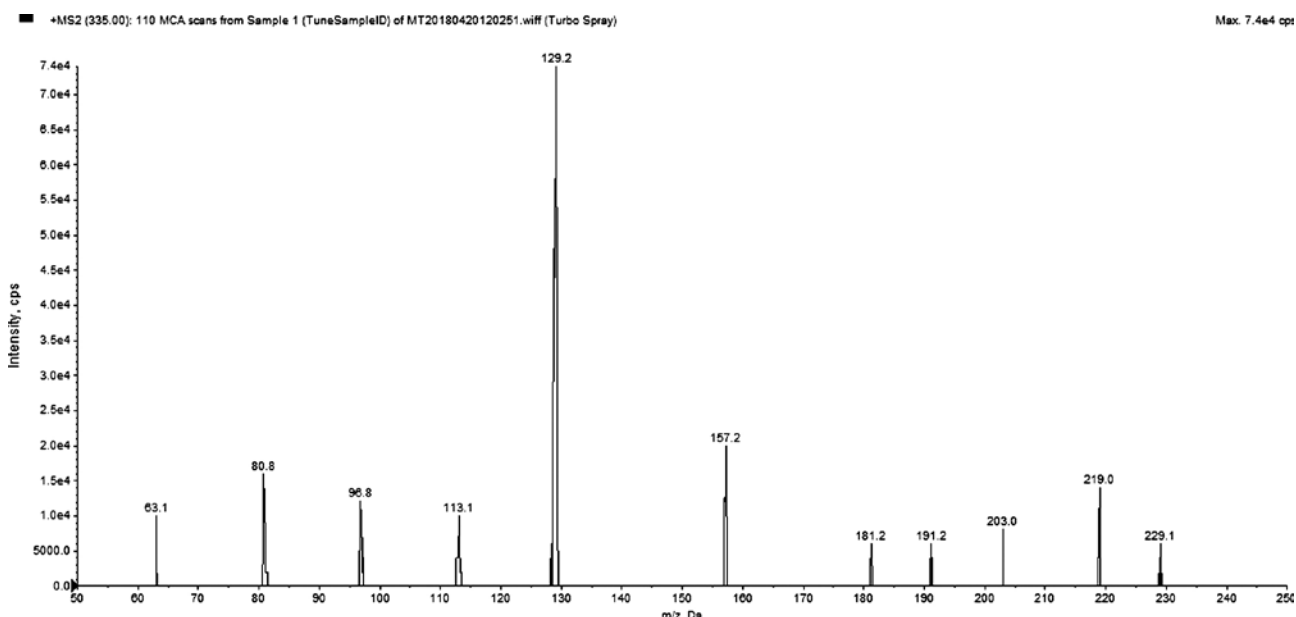


Рис. 4. Масс-спектр фосфата вальпрозоламида 2-го порядка (в режиме сканирования положительно заряженных ионов, для иона-предшественника m/z 336,0)

тральной). Содержание вальпрозоламида в суточной моче составило 1,96 мкг (95% ДИ: 1,88–2,02). Полученные данные позволили определить, что за сутки в неизменном виде с мочой вывелось в среднем 0,05% исследуемого лекарственного средства. Вальпроевой кислоты и ее метаболитов в моче обнаружено не было – факт, подтверждающий, что вальпрозоламид в организме не метаболизируется до вальпроевой кислоты, несмотря на наличие в его химической структуре фрагмента данной кислоты. Основными выявленными метаболитами вальпрозоламида в моче были его глюкуронид и фосфат. Полученные данные позволили сделать предположение, что основным направлением метаболизма вальпрозоламида является его конъюгация с глюкуроновой и фосфорной кислотами.

Заключение

Вальпрозоламид является новым противоэпилептическим средством из группы амидных производных вальпроевой кислоты. Экспериментальные исследования показали, что биодоступность вальпрозоламида при внутрижелудочном введении кроликам составляет 85,3%, $T_{1/2} = 7,67$, $kel = 0,105$ ч⁻¹, время удерживания вещества в плазме 8,91 ч, $Cl = 2,67$ л/ч/кг. Исследованный антиконвульсант в организме практически полностью метаболизируется, выводится в неизменном виде через почки с мочой в следовых количествах. Вальпрозоламид не превращается в вальпроевую кислоту и не образует продуктов ее окисления (2-пропил-4-пентеновой, 3-гидрокси-2-пропилпентановой, 4-гидрокси-2-пропилпентановой, 2-пропилпентандиовой и 3-оксо-2-

пропилпентановой кислот), большая часть которых обладает токсическими свойствами. Основным направлением метаболизма вальпроламида является конъюгация с глюкуроновой и фосфорной кислотами. Возможно, что с особенностями метаболизма связана меньшая токсичность вальпроламида по сравнению с вальпроевой кислотой.

Благодарности

Авторы выражают глубокую признательность д. х. н. профессору Скачиловой Софии Яковлевне за создание вальпроламида – нового отечественного противоэпилептического средства из группы производных вальпроевой кислоты.

Литература/References

1. Perucca, E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience / E. Perucca // *CNS Drugs*. – 2012. – № 16 (10). – P. 695–714.
2. Фрейдкова, Н.В. Вальпарин ХР в лечении эпилепсии (обзор литературы и описание клинических случаев) / Н.В. Фрейдкова, О.В. Пылаева, К.Ю. Мухин // *Русский журнал детской неврологии*. – 2015. – Т. 10, № 3. – С. 37–42.
3. Upendra, A. Effect of aging on glucuronidation of valproic acid in human liver microsomes and the role of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4, UGT1A8, and UGT1A10 / A. Upendra, A.P. Rimmel, R.P. Rimmel // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2009. – № 37 (1). – P. 229–236.
4. Дмитренко, Д.В. Генетические особенности метаболизма вальпроатов как фактор риска развития нежелательных лекарственных явлений / Д.В. Дмитренко, Н.А. Шнайдер, Ю.Б. Говорина и др. // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 5. – С. 1–9.
5. Дмитренко, Д.В. Geneticheskie osobennosti metabolizma val'proatov kak faktor riska razvitiya nezhelatel'nyh lekarstvennyh yavlenij / D.V. Dmitrenko, N.A. Shnajder, Yu.B. Govorina i dr. // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. – 2015. – № 5. – S. 1–9.
6. Пилюгина, М.С. Пути метаболизма препаратов вальпроевой кислоты и карбамазепина / М.С. Пилюгина // *Вестник клинической больницы № 51*. – 2010. – Т. 3, № 10. – С. 52–55.
7. Пилюгина, М.С. Puti metabolizma preparatov val'proevoj kisloty i karbamazepina / M.S. Pilyugina // *Vestnik klinicheskoy bol'nicy № 51*. – 2010. – Т. 3, № 10. – S. 52–55.
8. Шнайдер, Н.А. Хроническая интоксикация вальпроевой кислотой в эпилептологии: диагностика и лечение / Н.А. Шнайдер, Д.В. Дмитренко // *Неврология,*

нейропсихиатрия, психосоматика. – 2016. – № 8 (2). – С. 94–99.

Shnajder, N.A. Hronicheskaya intoksikaciya val'proevoj kislotoj v epileptologii: diagnostika i lechenie / N.A. Shnajder, D.V. Dmitrenko // *Nevrologiya, nejropsihiatriya, psihosomatika*. – 2016. – № 8 (2). – S. 94–99.

7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К., 2012. – 944 с.

Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennyh sredstv // Pod red. A.N. Mironova. – M.: Grif i K., 2012. – 944 s.

8. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Government Printing Office, Washington, DC, 2001.

9. Малыгин, А.С. Разработка и валидация методики ВЭЖХ-масс-спектрометрического определения вальпроатов в плазме крови / А.С. Малыгин, Н.С. Попов, М.А. Демидова, М.А. Горшкова // *Вестник ТвГУ. Сер. Биология и экология*. – 2018. – № 1. – С. 47–57.

Malygin, A.S. Razrabotka i validaciya metodiki VEZhH-mass-spektrometricheskogo opredeleniya val'proatov v plazme krovi / A.S. Malygin, N.S. Popov, M.A. Demidova, M.A. Gorshkova // *Vestnik TvGU. Ser. Biologiya i ekologiya*. – 2018. – № 1. – S. 47–57.

10. Малыгин, А.С. Определение вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) / А.С. Малыгин, Н.С. Попов, М.А. Демидова, М.Н. Кудряшова // *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. – 2018. – № 2. – С. 35–42.

Malygin, A.S. Opredelenie val'proevoj kisloty i ee metabolitov v plazme krovi metodom VEZhH-mass-spektrometrii (VEZhH-MS/MS) / A.S. Malygin, N.S. Popov, M.A. Demidova, M.N. Kudryashova // *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya*. – 2018. – № 2. – S. 35–42.

11. Малыгин, А.С. Использование ВЭЖХ-масс-спектрометрии для терапевтического лекарственного мониторинга вальпроатов / А.С. Малыгин, Н.С. Попов, М.А. Демидова и др. // *Верхневолжский медицинский журнал*. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 27–33.

Malygin, A.S. Ispol'zovanie VEZhH-mass-spektrometrii dlya terapevticheskogo lekarstvennogo monitoringa val'proatov / A.S. Malygin, N.S. Popov, M.A. Demidova i dr. // *Verhnevolzhskij medicinskij zhurnal*. – 2018. – Т. 17, № 2. – S. 27–33.

Малыгин Александр Сергеевич (контактное лицо) – ординатор кафедры фармакологии, клинической фармакологии ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России. 170100, Тверь, ул. Советская, 4. Тел. 8 (4822) 34-55-38; e-mail: dr.a.s.m@yandex.ru.