

ОЦЕНКА РОЛИ ПЕЧЕНОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА В БИОТРАНСФОРМАЦИИ СИДНОНИМИНОВ *IN VIVO*Н. С. Попов¹✉, В. М. Терехов¹, М. С. Баранов², В. Ю. Балабаньян², Д. Е. Каурова², И. Н. Мяснянко², Е. А. Терехова¹¹ Тверской государственный медицинский университет, Тверь, Россия² Научно-исследовательский институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Исследование биотрансформации фармакологически активных молекул — важнейший этап разработки лекарственных средств, результаты которого позволяют выявить активные и токсичные метаболиты, прогнозировать лекарственные взаимодействия, а также являются фундаментальной основой для целенаправленного конструирования молекул новых лекарственных кандидатов. Основным органом, принимающим участие в биотрансформации лекарств, является печень. Широко используемые в настоящее время методы исследования метаболизма *in vitro* не позволяют выявить продукты внепеченочной биотрансформации лекарственных молекул. Целью исследования было разработать *in vivo* подход к определению роли печени в биотрансформации молекул лекарственных кандидатов. Предложенный подход основан на осуществлении сосудистой изоляции печени у лабораторных крыс, выполненной хирургическим путем. Участие данного органа в биотрансформации фармакологически активных молекул показано на примере соединения-лидера из группы сиднонимин, обладающего сосудорасширяющей активностью. Показано, что исключение печени из системного кровотока не приводит к образованию метаболитов изучаемого соединения, идентифицируемых с помощью хромато-масс-спектрометрии. Полученные результаты могут служить основой для прогнозирования фармакокинетики, эффективности и безопасности лекарственных средств.

Ключевые слова: биотрансформация, фармакокинетика, сиднонимин, вазодилаторы, хромато-масс-спектрометрия

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания, тема научно-исследовательской работы: «Разработка лекарственного кандидата, обладающего преимущественно центральным сосудорасширяющим действием для лечения цереброваскулярных патологий», номер госрегистрации — 124020900020-4.

Вклад авторов: Н. С. Попов — поиск метаболитов соединения BBP2023, разработка биоаналитической методики, подготовка рукописи; В. М. Терехов — разработка дизайна сосудистой изоляции печени у крыс, выполнение оперативного вмешательства; М. С. Баранов — синтез соединения BBP2023 и его метаболитов, подготовка рукописи; В. Ю. Балабаньян — постановка цели, разработка дизайна исследования, подготовка рукописи; Д. Е. Каурова — обзор литературы, подготовка рукописи; И. Н. Мяснянко — синтез соединения BBP2023 и его метаболитов, подготовка рукописи; Е. А. Терехова — разработка дизайна сосудистой изоляции печени у крыс, выполнение оперативного вмешательства; все авторы внесли равнозначный вклад в подготовку публикации, подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России (протокол № 5 от 19 июня 2024 г.). Все эксперименты выполнены в соответствии с Правилами лабораторной практики (приказ Минздрава России от 23.08.2010 № 708н, Директива Европейского парламента, Совет Европейского союза 2010/63/ЕС по защите позвоночных животных, используемых для научных целей).

✉ Для корреспонденции: Никита Сергеевич Попов
ул. Советская, д. 4, г. Тверь, 170100, Россия; ns.popov@mail.ru

Статья получена: 16.04.2025 **Статья принята к печати:** 30.04.2025 **Опубликована онлайн:** 15.05.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.026

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

IN VIVO ASSESSMENT OF THE ROLE OF LIVER METABOLISM IN SYDNONE IMINE BIOTRANSFORMATIONPopov NS¹ ✉, Terekhov VM¹, Baranov MS², Balabanyan VYu², Kaurova DE², Myasnyanko IN², Terekhova EA¹¹ Tver State Medical University, Tver, Russia² Research Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Assessment of pharmacologically active molecule biotransformation represents the most important phase of drug development, the results of which make it possible to identify active and toxic metabolites and provide a fundamental basis for the targeted design of new candidate drug molecules. The liver is the main organ involved in biotransformation of drugs. The currently widely used *in vitro* metabolism assessment methods do not allow one to identify products of extrahepatic drug molecule biotransformation. The study aimed to develop an *in vivo* approach to determination of the role of the liver in biotransformation of candidate drug molecules. The approach proposed is based on the vascular liver isolation performed surgically in laboratory rats. The organ involvement in biotransformation of pharmacologically active molecules is exemplified by the leader compound of the sydnone imine group possessing vasodilatory activity. It has been shown that elimination of the liver from systemic blood flow does not result in generation of the test compound metabolites identified by chromatography–mass spectrometry. The findings can provide the basis for prediction of drug pharmacokinetics, efficacy, and safety.

Keywords: biotransformation, pharmacokinetics, sydnone imines, vasodilators, chromatography–mass spectrometry

Funding: the study was carried out under the state assignment for the research project "Development of the Candidate Drug Possessing Mostly Central Vasodilatory Activity for Treatment of Cerebrovascular Disorders", state registration number 124020900020-4.

Author contribution: Popov NS — search for the BBP2023 compound metabolites, bioanalytical method development, manuscript writing; Terekhov VM — developing the design of vascular liver isolation in rats, surgical procedure; Baranov MS — synthesis of the BBP2023 compound and its metabolites, manuscript writing; Balabanyan VYu — goal setting, developing the study design, manuscript writing; Kaurova DE — literature review, manuscript writing; Myasnyanko IN — synthesis of the BBP2023 compound and its metabolites, manuscript writing; Terekhova EA — developing the design of vascular liver isolation in rats, surgical procedure; all authors contributed to the publication equally, they confirm compliance of authorship with the ICMJE international criteria.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Tver State Medical University (protocol No. 5 dated 19 June 2024). All experiments were conducted in accordance with the principles of Good Laboratory Practice (Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 708n of 23.08.2010, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes).

✉ **Correspondence should be addressed:** Nikita S. Popov
Sovetskaya, 4, Tver, 170100, Russia; ns.popov@mail.ru

Received: 16.04.2025 **Accepted:** 30.04.2025 **Published online:** 15.05.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.026

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Исследование биотрансформации молекул-кандидатов — важнейший этап разработки лекарственных средств (ЛС) [1]. Образование токсичных метаболитов ЛС является фактором, вносящим существенный вклад в безопасность проводимой фармакотерапии и причиной неудач при проведении доклинических и клинических испытаний [2]. Наоборот, образование фармакологически активных метаболитов может значительно повышать эффективность применения ЛС [3], а также служить основой для разработки новых лекарственных молекул [4]. Сведения о биотрансформации ЛС имеют важное значение на этапе разработки состава и технологии производства лекарственных форм [5], а также позволяют прогнозировать многие лекарственные взаимодействия [6]. Кроме того, данные о путях метаболизма известных соединений лежат в основе целенаправленного конструирования молекул новых лекарственных кандидатов [7].

Основным органом, принимающим участие в биотрансформации ЛС, является печень [8]. Исследование метаболизма лекарственных кандидатов на этапе ранней разработки в основном осуществляют *in vitro* путем инкубирования веществ с микросомальной фракцией печени, содержащей различные ферменты [9–11]. Данный подход общепринят, доступен и воспроизводим [12]. Кроме того, он позволяет идентифицировать отдельные цитохромы, участвующие в метаболизме конкретного вещества [13]. Однако такой способ имеет ряд существенных недостатков, среди которых можно выделить отсутствие возможности выявления продуктов внепеченочной биотрансформации ЛС [14]. Альтернативным подходом является исследование биотрансформации *in vivo*, при котором лабораторные животные получают исследуемый препарат, после чего через определенное время у них производят забор биологического материала (плазма крови, моча, фрагменты внутренних органов), который исследуют на предмет содержания вероятных метаболитов [15]. Полученные при этом результаты также не могут дать точное представление об участии печени в процессах биотрансформации ЛС.

Один из подходов к определению участия печени в метаболизме фармакологически активных веществ — исключение данного органа из системного кровотока хирургическим путем, проводимое непосредственно перед введением исследуемого препарата. Сравнение результатов хромато-масс-спектрометрического определения вероятных метаболитов в биоматериале, полученных от лабораторных животных с сосудистой изоляцией печени и без нее, позволяет сделать выводы о роли гепатоцитов в биотрансформации исследуемых молекул.

Цель настоящего исследования — разработка *in vivo* подхода к определению роли печени в биотрансформации молекул лекарственных кандидатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все экспериментальные работы, включая фармакологическую и биоаналитическую часть, были выполнены на базе научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России.

В качестве объекта экспериментального изучения участия печени в биотрансформации лекарственных средств использовали соединение-лидер ВВР2023, представляющее собой производное сиднонимина, обладающее сосудорасширяющей активностью (рис. 1).

На первом этапе исследования на основании сведений об общих путях биотрансформации ксенобиотиков осуществляли прогнозирование структуры предполагаемых метаболитов соединения ВВР2023, для которых рассчитывали точные значения моноизотопных масс (табл. 1).

На втором этапе проводили фармакологический эксперимент, целью которого было получение биологического материала (плазма крови), содержащего вероятные метаболиты. Исследования были выполнены на самцах крыс Wistar пола массой около 250 г (питомник ООО «СМК СТЕЗАР», Россия). Клетки с животными находились в контролируемых условиях окружающей среды (20–26 °C и 30–70% относительная влажность). В комнатах содержания животных поддерживали 12-часовой цикл освещения и производили 8–10-кратную смену объема воздуха в час. Крыс кормили полнорационным комбикормом ПК-120 («Лабораторкорм», Россия), поили фильтрованной водопроводной водой *ad libitum*. Чистку клеток, влажную уборку комнат, а также замену бутылок с водой на новые осуществляли ежедневно. Вечером накануне эксперимента животные были лишены корма.

В ходе проведения исследования трем крысам однократно внутрижелудочно вводили активную фармацевтическую субстанцию (АФС) ВВР2023 в форме 10%-й эмульсии кукурузного масла в дозе 1/100 LD₅₀. Через 3 ч после введения препарата производили забор крови из хвостовой вены крыс в объеме 0,1 мл с помощью инсулинового шприца, содержащего 2 МЕ гепарина натрия. Собранную кровь немедленно переносили в пробирки типа Эппендорф объемом 0,2 мл, плазму получали с помощью лабораторной центрифуги LMC-4200R (Biosan, Латвия) при комнатной температуре и частоте вращения ротора 3000 об./мин в течение 10 мин. Полученную плазму в объеме 50 мкл объединяли с 800 мкл метанола с добавлением 0,5% муравьиной кислоты, пробы перемешивали на вортексе Microspin FV-2400 (Biosan, Латвия) в течение 15 с, выдерживали при температуре –40 °C — в морозильнике MDF-136 (Sanyo, Япония) в течение 30 мин, после чего супернатант отделяли с помощью центрифуги D-37520 (Sigma, Германия) при ускорении 15 000 g и температуре –10 °C

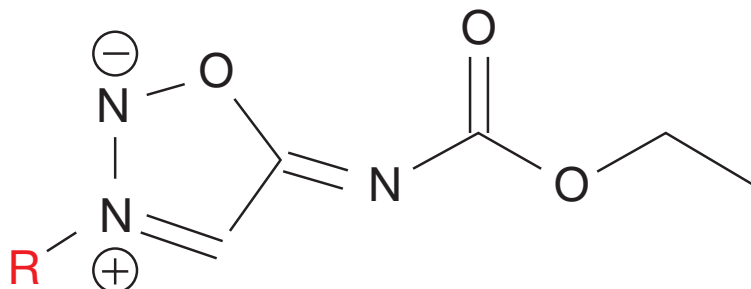


Рис. 1. Структурная формула ВВР2023, где R — разветвленный предельный углеводородный радикал (C₇H₁₅)

Таблица 1. Предполагаемые продукты биотрансформации соединения BVP2023 и их моноизотопные молекулярные массы

Вероятный метаболит	Молекулярная масса, Да	Вероятный метаболит	Молекулярная масса, Да
BVP2023	255,16	R-NH ₂	115,13
BVP2023 + OH	271,15	BVP2023 + OH + глюкуроновая кислота	447,19
BVP2023 + 2OH	287,15	BVP2023 - (CO)OC ₂ H ₅ + OH + глюкуроновая кислота	375,16
BVP2023 + 3OH	303,15	R-NH ₂ + OH	131,13
BVP2023 - (CO)OC ₂ H ₅	183,14	R-NH ₂ + OH + глюкуроновая кислота	307,16
BVP2023 - (CO)OC ₂ H ₅ + OH	199,13	BVP2023 + OH + серная кислота	351,11
BVP2023 - (CO)OC ₂ H ₅ + 2OH	215,13	BVP2023 + глутатион	560,23
BVP2023 - (CO)OC ₂ H ₅ - NO	154,15	BVP2023 - (CO)OC ₂ H ₅ - NO + OH + глюкуроновая кислота	346,17

Примечание: R — разветвленный предельный углеводородный радикал (C₇H₁₅).

в течение 20 мин. Надосадочную жидкость пропускали через мембранный фильтр 0,22 мкм («Лаборатория воды», Россия), напрямую вводили в электрораспылительный источник ионов масс-спектрометра AB Sciex 3200 MD Qtrap (Sciex, Сингапур) с помощью встроенного шприцевого насоса со скоростью 10 мкл/мин. Вначале проводили масс-спектрометрический анализ соединения BVP2023 с целью идентификации характеристических ионов-продуктов (режим Product Ion). Учитывая, что потенциальные метаболиты при фрагментации могут образовывать ионы-продукты, по значению m/z (отношение массы к числу зарядов) совпадающие с фрагментарными ионами соединения BVP2023, проводили обратный скрининг молекулярных ионов по соответствующим ионам-продуктам (режим Precursor Ion). Выявленные сигналы сравнивали с теоретически рассчитанными значениями моноизотопной массы предполагаемых метаболитов. В случае совпадения этих значений выявленные продукты биотрансформации соединения BVP2023 подвергали масс-спектрометрическому анализу в режиме Product Ion с целью косвенного подтверждения химической структуры. Результаты масс-спектрометрического исследования в дальнейшем были использованы для детектирования предполагаемых метаболитов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) при осуществлении

хроматографического анализа плазмы крови интактных крыс и животных, получавших соединение BVP2023. С этой целью были подобраны условия хроматографирования, указанные в табл. 2.

Для оценки участия печени в биотрансформации соединения BVP2023 на третьем этапе эксперимента у трех крыс было осуществлено оперативное вмешательство с целью исключения данного органа из системного кровотока. В зоне проведения операции у животных полностью удаляли шерсть с кожи, для премедикации подкожно вводили 0,1%-й раствор атропина сульфата («Дальхимфарм», Россия) в дозе 0,04 мг/кг. Крыс позиционировали на спине. Под наркозом, вызванным подкожным введением комбинации тилетамина гидрохлорида 5 мг, золазепама 5 мг (Золетил, Virbac, Франция) и ксилазина 4 мг («Нита-Фарм», Россия), производили верхнесрединную лапаротомию, петли кишечника извлекали, отводили влево, оборачивали салфетками, смоченными подогретым стерильным физиологическим раствором, устанавливали ранорасширитель Адсона. Выделяли воротную вену (*vena portae*) и чревный ствол (*truncus celiacus*), перевязывали нитью лавсан USP 3/0 («Медтехника», Россия) и пересекали между лигатурами (рис. 2). Важный момент при перевязке воротной вены — наложение лигатур до начала отхождения от нее ветвей, идущих в печень. После сосудистой

Таблица 2. Хроматографические параметры определения предполагаемых продуктов биотрансформации соединения BVP2023

Хроматограф	Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США)			
Хроматографическая колонка	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм			
Защитная колонка	Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 × 12,5 мм, 5 мкм			
Элюент А	Деионизированная вода + 0,1%-ная муравьиная кислота			
Элюент В	Ацетонитрил + 0,1%-ная муравьиная кислота			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% А	% В
	0,0	0,4	90	10
	1,0		90	10
	4,0		5	95
	8,0		5	95
	8,01		90	10
	12,0		90	10
Температура термостата колонки, ° С	30			
Объем пробы, мкл	10			
Общая продолжительность анализа, мин	12			
Промывка инжектора	Через порт промывки, 3 с, 50%-й водный раствор метанола			

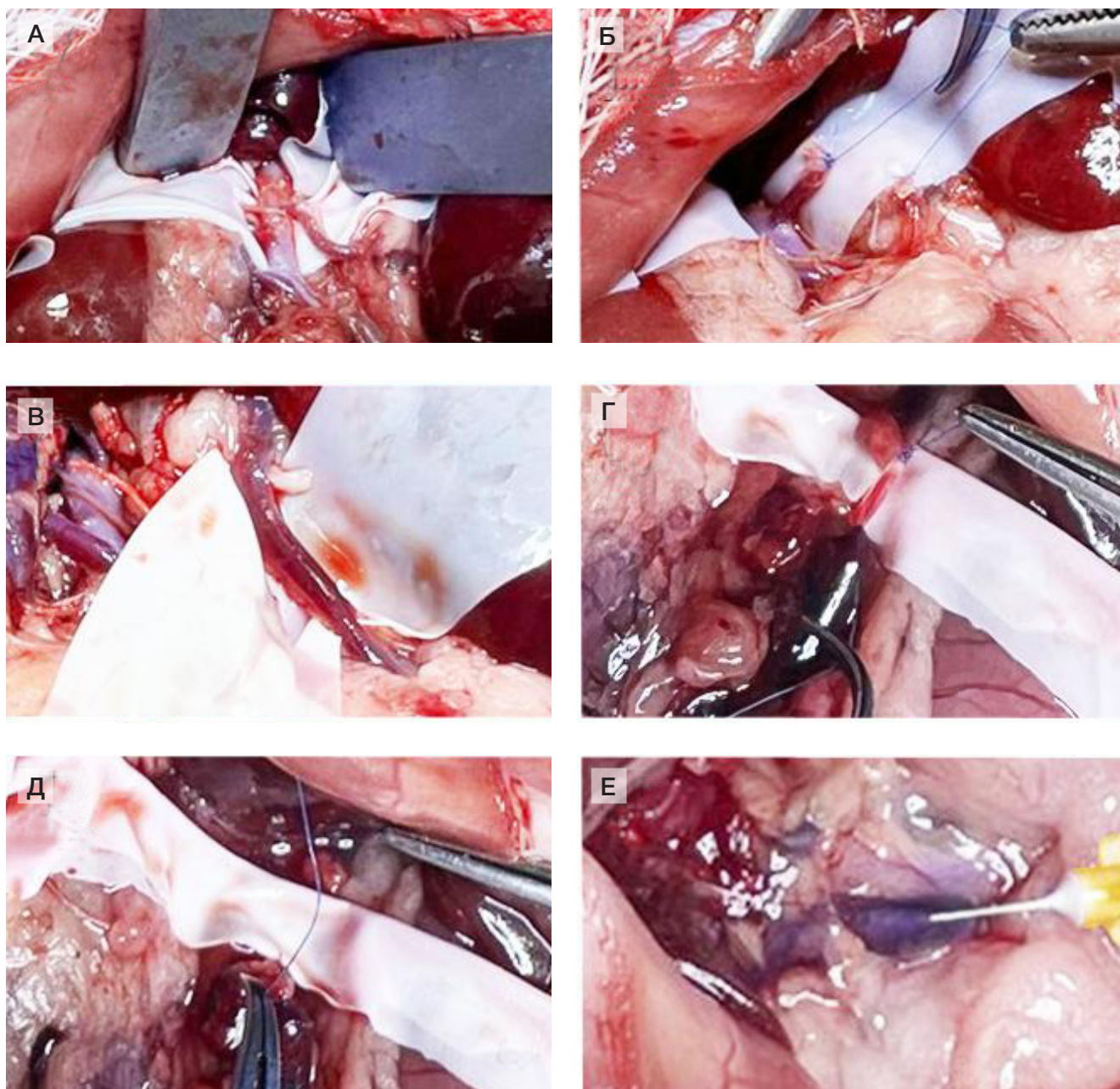


Рис. 2. Процесс сосудистой изоляции печени у крыс и внутривенное введение препарата BVP2023. **А.** Скелетизация брюшной аорты (*aorta abdominalis*) с чревным стволом (*truncus celiacus*) **Б.** Культи чревного ствола с наложенными на него лигатурами. **В.** Выделение воротной вены (*vena portae*). **Г.** Воротная вена с наложенными на нее лигатурами. **Д.** Пересечение воротной вены между лигатурами. **Е.** Введение препарата в нижнюю полую вену (*v. cava inferior*). Для повышения информативности в ходе проведения операции использовали контраст из стерильной латексной перчатки

изоляции печени в подпеченочный сегмент нижней полой вены (*vena cava inferior*) с помощью инсулинового шприца с иглой 30G (Inecta, Китай) вводили раствор (27,5 мг/мл) соединения BVP2023 в объеме 0,1 мл ($1/100 LD_{50}$), на место прокола накладывали гемостатическую губку («Лужский завод Белкозин», Россия). После достижения гемостаза лапаротомную рану ушивали послойно.

Через 3 ч после введения препарата производили забор крови из хвостовой вены крыс; получение и дальнейшую пробоподготовку плазмы осуществляли по ранее указанной методике. Обработанные образцы подвергали хроматографическому анализу с целью обнаружения метаболитов соединения BVP2023. Кроме того, выполняли исследование биоматериала, полученного от интактных крыс и ложнооперированных животных (без изоляции печени), которым внутривенно

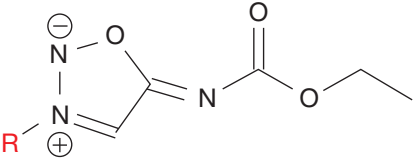
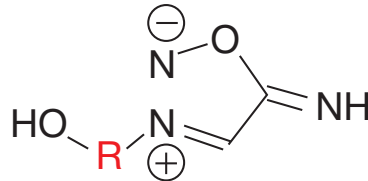
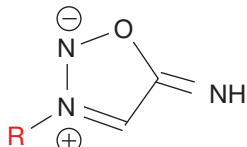
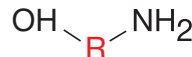
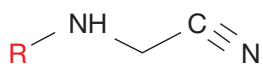
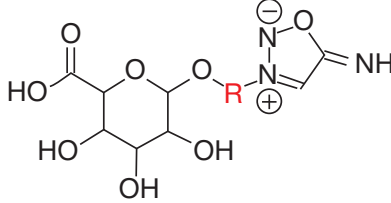
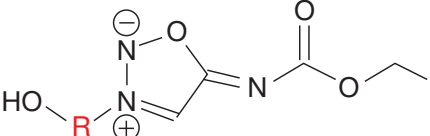
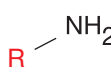
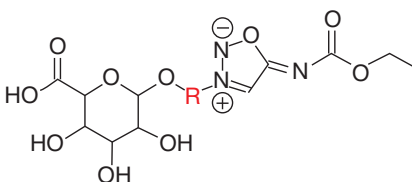
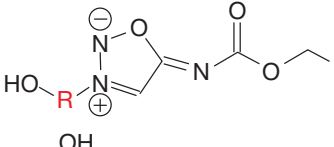
вводили препарат аналогичным образом. После забора крови животных подвергали эвтаназии с помощью ингаляции углекислого газа.

Обработку первичных данных хромато-масс-спектрометрического анализа выполняли с помощью встроенного программного обеспечения (ПО) AB Sciex Analyst 1.3.6 (AB Sciex, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате скрининга плазмы крови крыс, которым внутрижелудочно вводили исследуемый препарат, было выявлено наличие метаболита, представляющего собой соединение BVP2023, лишенное этоксикарбонильной группы. Кроме этого, обнаружен продукт, образующийся после отщепления монооксида азота (NO) от

Таблица 3. Структурные формулы идентифицированных метаболитов соединения BVP2023 и MRM-переходы, используемые для детекции при хроматографическом анализе

Структурная формула	MRM-переход, m/z	Структурная формула	MRM-переход, m/z
	256,2/57,1 256,2/102,1		200,1/73,1 200,1/86,1
	184,1/57,1 184,1/86,1		132,1/114,1 132,1/86,1
	155,2/57,1 155,2/95,0		376,2/86,1 376,2/115,1 376,2/183,1
	272,2/102,1 272,2/73,1		
	116,1/57,1 116,1/99,1		448,2/255,2 448,2/158,1 448,2/102,1
	288,2/102,1 288,2/89,1		

Примечание: R — разветвленный предельный углеводородный радикал (C₇H₁₅).

вышеуказанной молекулы. Данный факт может косвенно свидетельствовать о предполагаемой фармакодинамике исследуемого соединения-лидера. Также в результате скрининга были выявлены моно- и дигидроксилированные производные вышеуказанных метаболитов и исходного соединения, а также эфиры этих соединений с глюкуроновой кислотой (табл. 3). Некоторые выявленные метаболиты были синтезированы и использованы в качестве стандартов для постановки методики и последующего проведения хроматографического анализа. Совпадение времени удерживания данных соединений подтверждает правильность их идентификации на этапе скрининга.

По результатам исследования плазмы интактных крыс не выявлено хроматографических пиков, соответствующих соединению BVP2023 и его метаболитам, что подтверждает селективность разработанной методики идентификации. Анализ образцов плазмы ложнооперированных животных (без изолирования печени), которым внутривенно вводили исследуемое соединение в дозе 1/100 LD₅₀ за 3 ч до забора крови, позволил обнаружить хроматографические

сигналы всех выявленных на втором этапе продуктов биотрансформации (рис. 3).

Результаты хроматографического анализа плазмы крови крыс, которые получали АФС BVP2023 в аналогичной дозе после осуществления сосудистой изоляции печени, подтвердили наличие сигнала, соответствующего исходному соединению. При этом площадь хроматографического пика превышала таковую при анализе биоматериала, полученного от ложнооперированных животных, в среднем в 2,8 раз. Кроме того, выявлено отсутствие пиков, соответствующих ранее обнаруженным продуктам биотрансформации соединения BVP2023 (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты позволяют сделать заключение о непосредственном участии печени в образовании идентифицированных метаболитов соединения BVP2023 у крыс. Важным фактором при осуществлении вышеописанного эксперимента было использование абсолютно здоровых животных, так как любые

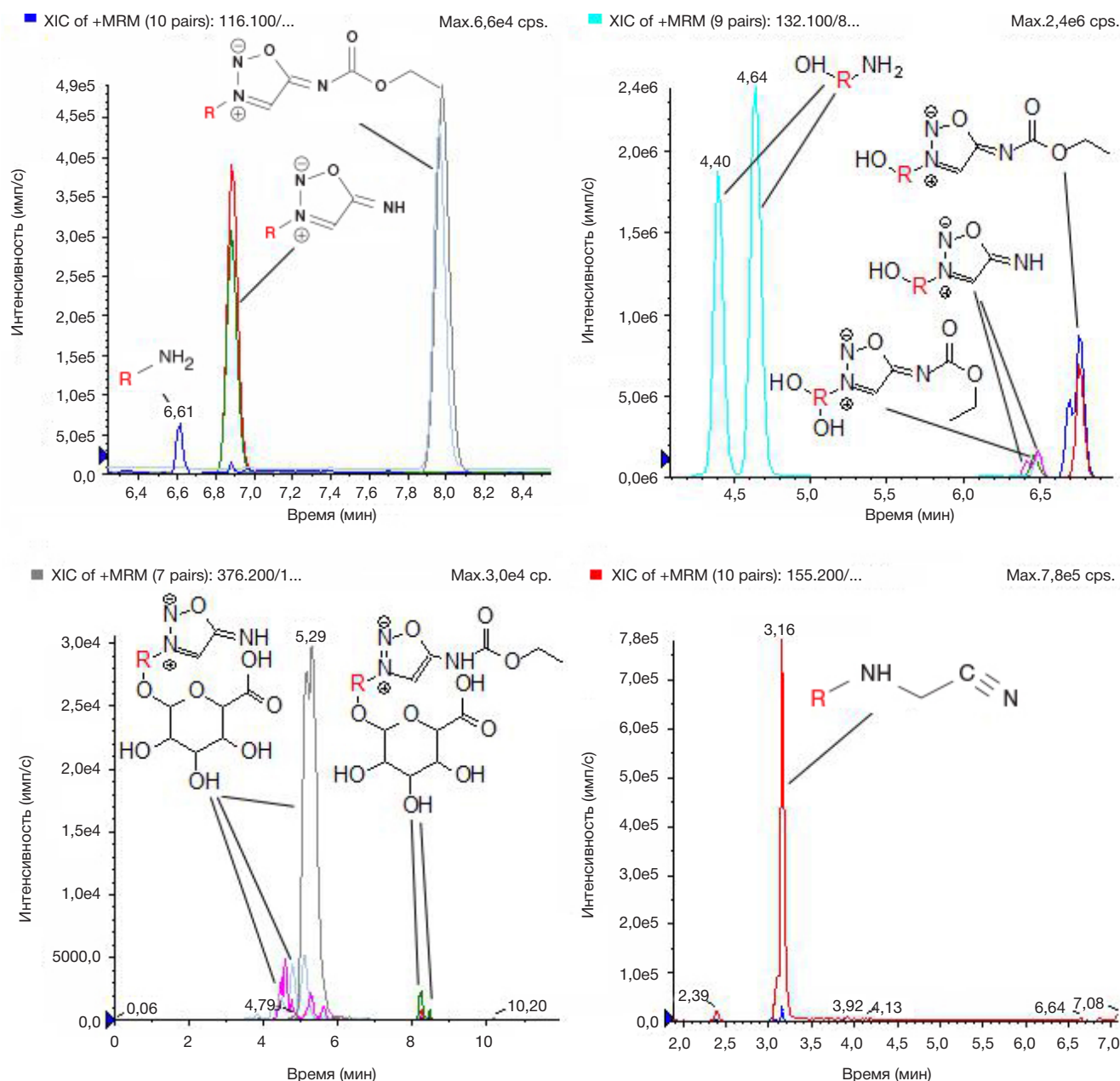


Рис. 3. Фрагменты хроматограмм плазмы крови ложнооперированных крыс, которым внутривенно вводили соединение BVP2023 в дозе 1/100 LD₅₀. R — разветвленный предельный углеводородный радикал (C₇H₁₅)

повреждения гепатоцитов, приводящие к появлению в плазме крови печеночных ферментов, могут существенно повлиять на достоверность полученных результатов. Одним из недостатков данного подхода является невозможность исследовать препараты, имеющие исключительно энтеральные лекарственные формы. Попадание изучаемого вещества в системный кровоток в этом случае невозможно по причине наложения лигатуры на воротную вену. Кроме того, при проведении данного эксперимента следует учитывать возможное взаимодействие лекарственного кандидата с компонентами наркоза.

Одним из вариантов реализованного подхода является использование временного ограничения кровотока через печень путем наложения хирургических клипс на соответствующие сосуды. Через определенное время после введения препарата осуществляется забор крови с последующим восстановлением кровотока. Повторное взятие крови через установленный временной интервал с дальнейшим анализом плазмы на предмет наличия

метаболитов позволит учитывать индивидуальные особенности животного в биотрансформации конкретного лекарственного кандидата. Вероятно, подобный подход может быть реализован и в отношении других органов, например почек.

ВЫВОДЫ

Предложенный в настоящем исследовании подход к оценке участия печени в биотрансформации кандидатных молекул на ранних этапах разработки лекарственных средств является универсальным и информативным. Он может быть использован как самостоятельный прием изучения метаболизма *in vivo*, так и в дополнении к широко применяемым методам *in vitro*. Полученные в ходе реализации данного подхода результаты могут служить основой для прогнозирования фармакокинетики, эффективности и безопасности лекарственных средств.

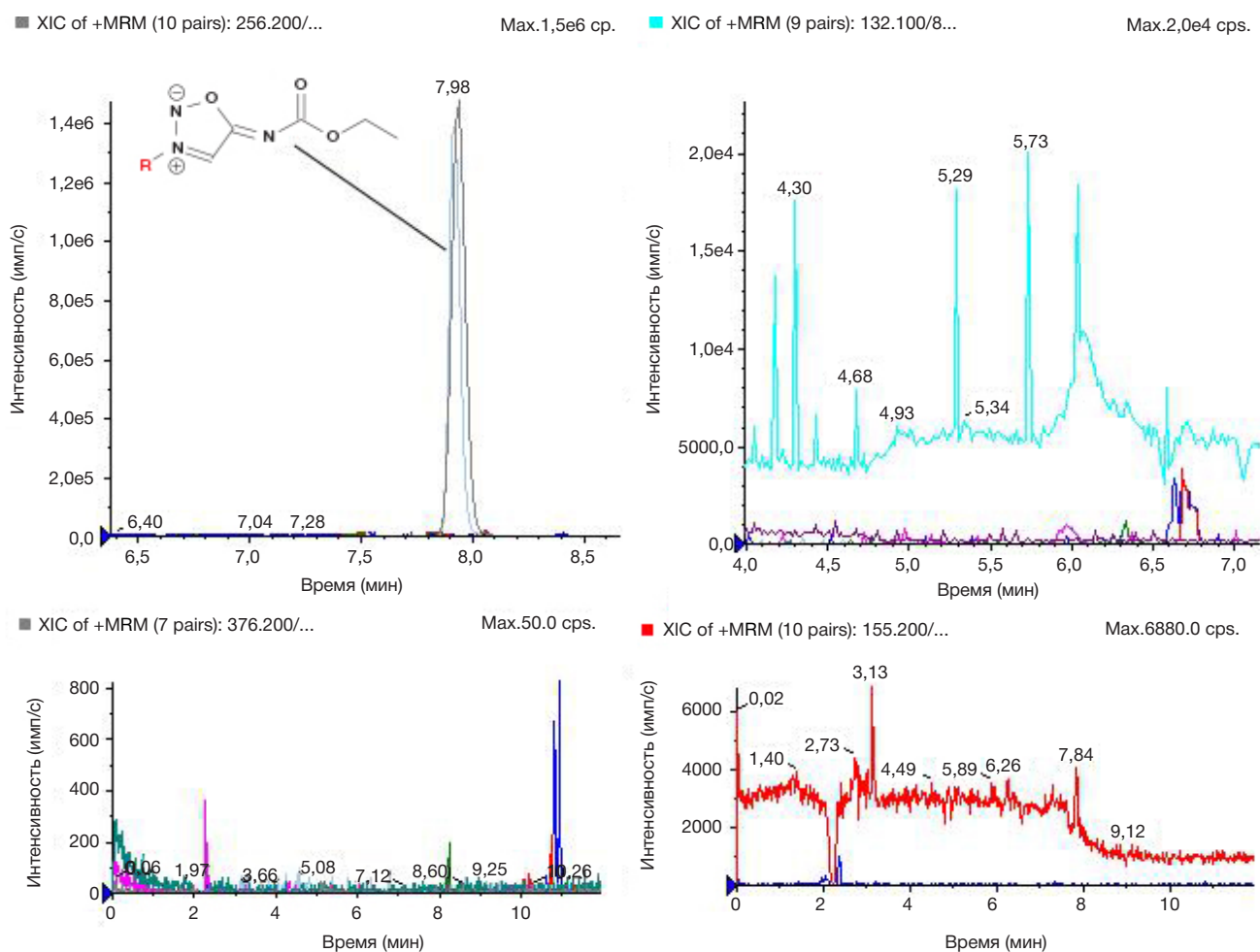


Рис. 4. Фрагменты хроматограмм плазмы крови крыс с сосудистой изоляцией печени, получавших внутривенно соединение ВВР2023 в дозе 1/100 LD₅₀. R — разветвленный предельный углеводородный радикал (C₇H₁₅)

Литература

- Shanu-Wilson J, Evans L, Wrigley S, Steele J, Atherton J, Boer J. Biotransformation: impact and application of metabolism in drug discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letter*. 2020; 11 (11): 2087–2107. DOI: 10.1021/acsmmedchemlett.0c00202.
- Baillie TA, Rettie AE. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra- and inter-species differences in drug metabolism. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2011; 26 (1): 15–29. DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-089.
- Obach RS. Pharmacologically active drug metabolites: impact on drug discovery and pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*. 2013; 65 (2): 578–640. DOI: 10.1124/pr.111.005439.
- Fura A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. *Drug discovery today*. 2006; 11 (3–4): 133–42. DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03681-0.
- Mahanur V, Rajge R, Tawar MA. Review on emerging oral dosage forms which helps to bypass the hepatic first pass metabolism. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*. 2022; 12 (1): 47–52. DOI: 10.52711/2231-5713.2022.00009.
- Klomp F, Wenzel C, Drozdik M, Oswald S. Drug–drug interactions involving intestinal and hepatic CYP1A enzymes. *Pharmaceutics*. 2020; 12 (12): 1201. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121201.
- Cerny MA, Kalgutkar AS, Obach RS, Sharma R, Spracklin DK, Walker GS. Effective application of metabolite profiling in drug design and discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020; 63 (12): 6387–406. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01840.
- Rai M, Paudel N, Sakhrie M, Gemmati D, Khan IA, Tisato V, Singh AV. Perspective on quantitative structure–toxicity relationship (QSTR) models to predict hepatic biotransformation of xenobiotics. *Livers*. 2023; 3 (3): 448–62. DOI: 10.3390/livers3030032.
- Peeters L, Vervliet P, Foubert K, Hermans N, Pieters L, Covaci A. A comparative study on the in vitro biotransformation of medicagenic acid using human liver microsomes and S9 fractions. *Chemico-Biological Interactions*. 2020; 328: 109192. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109192.
- Horspool AM, Wang T, Scaringella YS, Taub ME, Chan TS. Human liver microsomes immobilized on magnetizable beads: a novel approach to study in vitro drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. 2020; 48 (8): 645–654. DOI: 10.1124/dmd.120.090696.
- Ooka M, Lynch C, Xia M. Application of in vitro metabolism activation in high-throughput screening. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21 (21): 8182. DOI: 10.3390/ijms21218182.
- Knights KM, Stresser DM, Miners JO, Crespi CL. In vitro drug metabolism using liver microsomes. *Current protocols in pharmacology*. 2016; 74 (1): 7–8. DOI: 10.1002/cpph.9.
- Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 41 (11): 1149–79. DOI: 10.1177/00912700122012724.
- Pelkonen O, Raunio H. In vitro screening of drug metabolism during drug development: can we trust the predictions? *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2005; 1 (1): 49–59. DOI: 10.1517/17425255.1.1.49.

15. Zhu C, Wan M, Cheng H, Wang H, Zhu M, Wu C. Rapid detection and structural characterization of verapamil metabolites in rats by UPLC–MSE and UNIFI platform. *Biomedical Chromatography*. 2020; 34 (1): e4702. DOI: 10.1002/bmc.4702.
16. Lee K, Lee JY, Lee K, Jung CR, Kim MJ, Kim JA, Oh SJ. Metabolite profiling and characterization of LW6, a novel HIF-1 α inhibitor, as an antitumor drug candidate in mice. *Molecules*. 2021; 26 (7): 1951. DOI: 10.3390/molecules26071951.

References

1. Shanu-Wilson J, Evans L, Wrigley S, Steele J, Atherton J, Boer J. Biotransformation: impact and application of metabolism in drug discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letter*. 2020; 11 (11): 2087–2107. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.0c00202.
2. Baillie TA, Rettie AE. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra-and inter-species differences in drug metabolism. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2011; 26 (1): 15–29. DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-089.
3. Obach RS. Pharmacologically active drug metabolites: impact on drug discovery and pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*. 2013; 65 (2): 578–640. DOI: 10.1124/pr.111.005439.
4. Fura A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. *Drug discovery today*. 2006; 11 (3–4): 133–42. DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03681-0.
5. Mahanur V, Rajge R, Tawar MA. Review on emerging oral dosage forms which helps to bypass the hepatic first pass metabolism. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*. 2022; 12 (1): 47–52. DOI: 10.52711/2231-5713.2022.00009.
6. Klomp F, Wenzel C, Drozdzik M, Oswald S. Drug–drug interactions involving intestinal and hepatic CYP1A enzymes. *Pharmaceutics*. 2020; 12 (12): 1201. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121201.
7. Cerny MA, Kalgutkar AS, Obach RS, Sharma R, Spracklin DK, Walker GS. Effective application of metabolite profiling in drug design and discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020; 63 (12): 6387–406. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01840.
8. Rai M, Paudel N, Sakhrie M, Gemmati D, Khan IA, Tisato V, Singh AV. Perspective on quantitative structure–toxicity relationship (QSTR) models to predict hepatic biotransformation of xenobiotics. *Livers*. 2023; 3 (3): 448–62. DOI: 10.3390/livers3030032.
9. Peeters L, Vervliet P, Foubert K, Hermans N, Pieters L, Covaci A. A comparative study on the in vitro biotransformation of medicagenic acid using human liver microsomes and S9 fractions. *Chemico-Biological Interactions*. 2020; 328: 109192. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109192.
10. Horspool AM, Wang T, Scaringella YS, Taub ME, Chan TS. Human liver microsomes immobilized on magnetizable beads: a novel approach to study in vitro drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. 2020; 48 (8): 645–654. DOI: 10.1124/dmd.120.090696.
11. Ooka M, Lynch C, Xia M. Application of in vitro metabolism activation in high-throughput screening. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21 (21): 8182. DOI: 10.3390/ijms21218182.
12. Knights KM, Stresser DM, Miners JO, Crespi CL. In vitro drug metabolism using liver microsomes. *Current protocols in pharmacology*. 2016; 74 (1): 7–8. DOI: 10.1002/cpph.9.
13. Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 41 (11): 1149–79. DOI: 10.1177/00912700122012724.
14. Pelkonen O, Raunio H. In vitro screening of drug metabolism during drug development: can we trust the predictions? *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2005; 1 (1): 49–59. DOI: 10.1517/17425255.1.1.49.
15. Zhu C, Wan M, Cheng H, Wang H, Zhu M, Wu C. Rapid detection and structural characterization of verapamil metabolites in rats by UPLC–MSE and UNIFI platform. *Biomedical Chromatography*. 2020; 34 (1): e4702. DOI: 10.1002/bmc.4702.
16. Lee K, Lee JY, Lee K, Jung CR, Kim MJ, Kim JA, Oh SJ. Metabolite profiling and characterization of LW6, a novel HIF-1 α inhibitor, as an antitumor drug candidate in mice. *Molecules*. 2021; 26 (7): 1951. DOI: 10.3390/molecules26071951.