

ФАРМАКОКИНЕТИКА

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-12-27-31

ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА IPAC-2015 – ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

В. П. Жердев¹, Г. Б. Колыванов¹, А. А. Литвин¹, О. Г. Грибакина¹,
П. О. Бочков¹, Р. В. Шевченко¹, В. В. Григорьев²

На крысах изучена фармакокинетика соединения IPAC-2015. После однократного внутривенного введения в дозе 30 мг/кг исследуемое вещество в организме крыс определяется на протяжении 24 ч. Период полувыведения IPAC-2015 составил около 11 ч. Показано, что тканевая доступность IPAC-2015 в хорошо васкуляризованных органах (печень, почки, селезенка) значительно выше, чем в скелетной мускулатуре. В органе-мишени — головном мозге — данный показатель составил 0,61. Абсолютная биодоступность соединения IPAC-2015 у крыс составила 27,54 %.

Ключевые слова: IPAC-2015; тканевая доступность; всасывание; экскреция; абсолютная биодоступность; высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Соединение IPAC-2015 (гидрохлорид 1-((3,5-диметиламантан-1-ил)амино)-3-(6-фтор-3,4-дигидро-1Н-карбазол-9(2Н)-ил)пропан-2-ола в настоящее время проходит доклинические исследования в качестве предполагаемого лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера. Значения LD₅₀ при внутривенном введении для IPAC-2015 составляет более 5000 мг/кг, что позволяет отнести это соединение к 5 классу опасности — веществам малотоксичным (ГОСТ 12.1.007–76). Исследована специфическая когнитивно-стимулирующая активность IPAC-2015 на модели нарушения когнитивных функций, вызванных максимальным электрошоком и скополамином, которые восстанавливало исследуемое соединение (в дозе 0,5 мг/кг), в чем оно существенно превосходило препарат сравнения мемантин (2,0 мг/кг) [4].

IPAC-2015 является эффективным и селективным обратимым ингибитором бутирилхолинэстеразы смешанного типа, что позволяет использовать его для коррекции когнитивных нарушений, характеризующихся дефицитом ацетилхолина. Также исследуемое соединение блокирует NMDA-рецепторы нейронов мозга, что свидетельствует о нейропротекторном действии IPAC-2015 [2]. IPAC-2015 эффективно ингибирует процесс “набухания” митохондрий мозга крыс и оказывает митопротекторный эффект на митохондриях мозга лабораторных крыс [3].

¹ ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

² ФГБУН Институт физиологически активных веществ, 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, Северный проезд, 1.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлена структурная формула изучаемого соединения.

IPAC-2015 представляет собой гомогенный порошок белого с сероватым оттенком цвета, без запаха, растворим в диметилсульфоксиде и диметилформамиде, умеренно растворим в спирте этиловом, очень мало растворим в воде, практически нерастворим в хлороформе. Температура плавления: 249 – 251 °С.

Изучение фармакокинетики IPAC-2015 после внутривенного (в/ж) и внутривенного (в/в) введения проводили на белых беспородных крысах-самцах (масса тела 200 ± 30 г). IPAC-2015 вводили внутривенно (в виде суспензии в 1 % крахмальном клейстере) и внутривенно (растворяя в воде дистиллированной с добавлением 1 капли твина-80) в дозе 30 мг/кг. Образцы крови отбирали в дискретные временные интервалы до введения (0,0) и через 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24 ч после введения исследуемого соединения. На каждую дискретную точку использовали по 5 животных.

Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены в соответствии с нормативной документацией, касающейся гуманного обращения с животными, и стандартными операционными процедурами (СОП) лаборатории фармакокинетики ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”. Проведение экспериментов с животными одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”.

Полученные путем декапитации животных образцы крови центрифугировали (2500 об/мин в течение 10 мин) с целью получения плазмы.

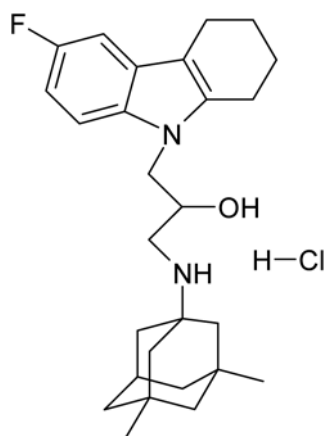


Рис. 1. Структурная формула IPAC-2015.

Для извлечения IPAC-2015 из биологической матрицы использовали метод жидкость-жидкостной экстракции. Образцы плазмы крови, хранящиеся в морозильной камере, размораживали при комнатной температуре. К образцам плазмы крови объемом 0,5 мл добавляли 250 мкл 1 % муравьиной кислоты и перемешивали на механическом, вихревом встряхивателе “Vortex”. К полученному раствору добавляли 10 мл диэтилового эфира и помещали на горизонтальный встряхиватель на 20 мин. После чего органический слой отделяли и упаривали в токе азота при 40 °С на водяной бане. Перед началом анализа образцы растворяли в 0,5 мл подвижной фазы.

Образцы гомогенатов органов крыс массой около 0,5 г гомогенизировали механическим перетиранием в ступке. В процессе гомогенизации к образцам добавляли последовательно 0,5 мл воды дистиллированной, затем 0,5 мл метанола и 0,5 мл воды дистиллированной. Полученный гомогенат смешивали с 250 мкл 1 % муравьиной кислоты, добавляли 15 мл диэтилового эфира, органический слой отделяли и упаривали в токе азота при 40 °С на водяной бане. Перед началом анализа образцы растворяли в 0,5 мл подвижной фазы.

Мочу и кал крыс собирали в течение 24 ч после однократного в/ж введения соединения в дозе 30 мг/кг.

В экстракционную пробирку переносили 1 мл мочи, прибавляли 10 мл диэтилового эфира. Содержимое пробирки встряхивали в течение 20 мин. Экстракцию проводили дважды. Дальнейшая процедура соответствовала извлечению изучаемого соединения из органов и тканей.

Кал высушивали в сушильном шкафу при температуре 50 °С. Навеску кала (0,5 г) измельчали, суспендировали и гомогенизировали в 2,0 мл подвижной фазы. К 5 мл полученной суспензии прибавляли 10 мл диэтилового эфира и встряхивали в течение 20 мин. Экстракцию проводили дважды. Дальнейшая процедура соответствовала извлечению изучаемого соединения из органов и тканей.

Для количественного определения IPAC-2015 в плазме крови, моче, кале и гомогенатах органов и тканей животных использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим определением.

Исследование выполнено на высокоэффективном жидкостном хроматографе с масс-селективным детектором типа “ионная ловушка” модели “Agilent 1200 SeriesLC/MSDIonTrap” (“Agilent”, США), оборудованный системой автоматического ввода пробы, внешним источником ионов с ионизацией электроспреем при атмосферном давлении и управляемый компьютером с системой обработки данных “ChemStation” (v.1.0). Условия хроматографического разделения: колонка ZorbaxExtend-C18 (100 × 2,1 мм; 3,5 мкм) “Agilent”, США, подвижная фаза: раствор “А” (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили водой деионизованной до общего объема 1,0 л) и раствор “Б” (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили ацетонитрилом до общего объема 1 л) фильтровали через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм “Sartorius” (ФРГ). Соотношение растворов “А” и “Б” — 40:60. Скорость потока 0,3 мл/мин. Тип детектирования: режим множественных молекулярных реакций (MRM) по дочернему иону с отношением массы к заряду $m/z = 163$, полученного изолированием и фрагментацией нативного молекулярного иона с отношением массы к заряду $m/z = 425$ (что соответствует протонированному молекулярному иону) IPAC-2015. Нижний предел количественного определения составил 5 нг/мл.

Основные фармакокинетические параметры IPAC-2015 рассчитаны модельно-независимым методом: AUC_{0-t} — площадь под кривой концентрация соединения — время после в/в или в/ж введения; C_0 — кажущаяся концентрация вещества в плазме крови после в/в введения в нулевой момент времени; T_{max} — время достижения максимальной концентрации исследуемого соединения в плазме крови после в/ж введения; C_{max} — максимальная концентрация IPAC-2015 в плазме крови после в/ж введения; MRT — среднее время удерживания исследуемого соединения в организме; k_{el} — константа скорости элиминации; $t_{1/2el}$ — период, за который выводится половина от введенной и всосавшейся дозы анализируемого вещества; Cl — плазменный клиренс после в/в введения; Cl/F — плазменный клиренс после в/ж введения; V_d — кажущийся объем распределения после в/в введения; V_d/F — кажущийся объем распределения после в/ж введения.

f_T — тканевая доступность, величину которой определяли следующим образом:

$$f_T = \frac{AUC_{T0-t}}{AUC_{p0-t}}$$

где AUC_{T0-t} — AUC в ткани, AUC_{p0-t} — AUC в плазме крови;

f_a — абсолютная биодоступность;

$$f_a = \frac{AUC_{p0-t}}{AUC_{iv0-t}} \cdot 100,$$

где AUC_{p0-t} — AUC в плазме крови после в/ж введения препарата; AUC_{iv0-t} — AUC в плазме крови после в/в введения исследуемого вещества [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Усредненные ФК профили ИРАС-2015 в плазме крови крыс после однократного в/ж и в/в введения представлены на рис. 2.

Снижение концентраций ИРАС-2015 в плазме крови также носит моноэкспоненциальный характер (рис. 2). Поскольку на каждую временную точку использовали по 5 животных, результирующая фармакокинетическая кривая была построена по усредненным концентрациям, поэтому при расчетах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов. Фармакокинетические параметры исследуемого соединения в плазме крови животных после однократного в/ж введения представлены в табл. 1.

После внутривенного введения ИРАС-2015 животным, вещество быстро всасывается из ЖКТ и определяется в плазме крови на протяжении 24 ч. Учитывая, что период полуэлиминации ($t_{1/2el}$) составил 11,11 ч ИРАС-2015 можно отнести к группе “долгоживущих” фармакологических веществ (ФВ). Такие фармакокинетические параметры, как $t_{1/2el}$, среднее время удерживания вещества в организме (MRT — 17,97 ч) и общий плазменный клиренс (Cl/F — 0,023 л/ч/кг) указывают на достаточно долгое нахождение исследуемого ФВ в системном кровотоке животных. Максимальная концентрация (C_{max}) в плазме крови регистрировалась через 2 ч (T_{max}) после введения, а ее величина составила 111,46 нг/мл. Величина кажущегося объема распределения (V_d/F) ИРАС-2015 после в/ж введения в дозе 30 мг/кг составила 0,369 л/кг. Кажущийся объем распределения обычно не эквивалентен анатомическому объему, а отражает распределение ФВ и степень его связывания в организме. Так, если ФВ связывается преимущественно белками крови, V_d будет меньше, чем реальный показатель. С другой стороны, преимущественное связывание ФВ во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения V_d над реальным объемом. В нашем случае, расчет величины V_d/F дал невысокие значения, указывающие, что ИРАС-2015 распределяется в основном во внесосудистом пространстве (органах) животных и не накапливается в тканях [5].

После в/в введения ИРАС-2015 животным в дозе 30 мг/кг это ФВ также, как после в/ж введения определяется в плазме крови на протяжении 24 ч.

Такие фармакокинетические параметры, как $t_{1/2el}$, равный 7,94 ч, MRT — 8,64 ч, указывают на длительное нахождение исследуемого ФВ в системном кровотоке

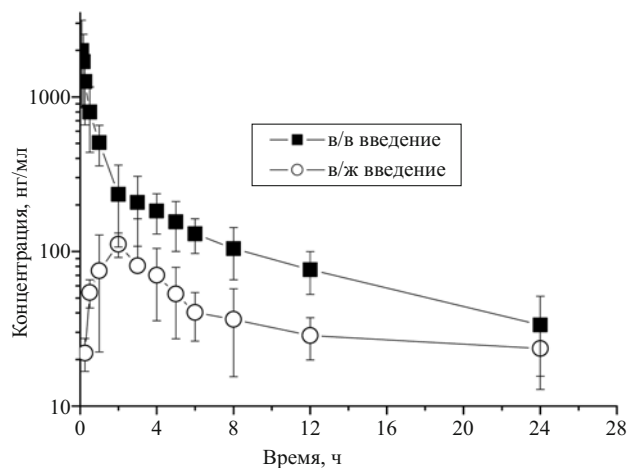


Рис. 2. Фармакокинетические профили ИРАС-2015 в плазме крови крыс после однократного в/в и в/ж введения ИРАС-2015 в дозе 30 мг/кг ($n = 5$; $\bar{x} \pm SD$).

токе животных. Кажущаяся начальная концентрация (C_0) ИРАС-2015 в плазме крови крыс составила 2316,56 нг/мл. Величина V_d значительно отличалась от значения, полученного после в/ж введения, и составила 0,009 л/кг.

Абсолютная биодоступность ИРАС-2015 после в/ж введения в сравнении с в/в введением составила 27,54 %, что говорит о потенциальной возможности разработки капсулированной лекарственной формы для этого ФВ.

Важным этапом при проведении фармакокинетических исследований является изучение тканевой доступности новых ФВ. Основным результатом процессов распределения является транспорт ФВ средства в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими его эффект. На основании определения величины тканевой доступности возможна

Таблица 1. Фармакокинетические параметры ИРАС-2015 в плазме крови крыс после однократного в/ж и в/в введения ИРАС-2015 в дозе 30 мг/кг

Параметр	Единица измерения	Путь введения	
		в/ж	в/в
C_0	нг/мл	-	2316,56
C_{max}	нг/мл	111,46	-
T_{max}	ч	2,00	-
AUC_{0-t}	нг/мл · ч	934,33	3392,08
k_{el}	ч ⁻¹	0,0624	0,0873
$AUC_{0-\infty}$	нг/мл · ч	1312,25	3775,78
$AUC_{t-\infty}$	%	28,80	10,16
$t_{1/2el}$	ч	11,11	7,94
MRT	ч	17,97	8,64
Cl	л/ч/кг	-	0,009
Cl/F	л/ч/кг	0,023	-
V_d	л/кг	-	0,910
V_d/F	л/кг	0,369	-
f_{abs}	%	27,54	-

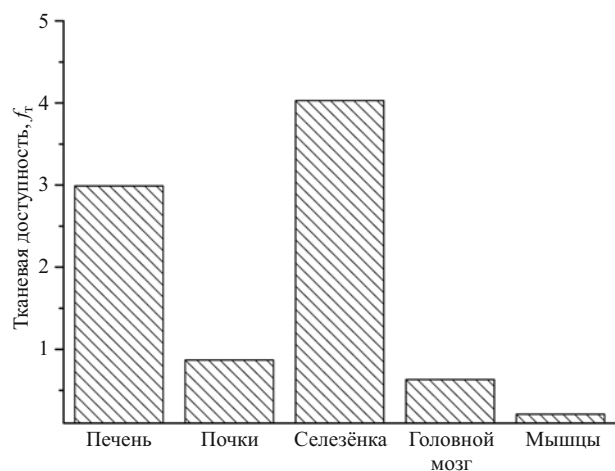


Рис. 3. Тканевая доступность IPAC-2015 в органах крыс после однократного в/ж введения в дозе 30 мг/кг.

количественная оценка интенсивности проникновения действующего ФВ в периферические ткани.

Распределение IPAC-2015 изучали в органах и тканях, отличающихся друг от друга различной степенью кровоснабжения (селезенка, скелетные мышцы), органах, обеспечивающих элиминацию (печень, почки), органе-мишени — головном мозге. Установлено, что IPAC-2015 регистрируется во всех исследуемых органах и тканях.

В распределении препарата по органам прослеживается значительная гетерогенность. На рис. 3 и в табл. 2 представлены полученные результаты.

Исследуемое соединение определяется в органах в течение 24 ч. Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) IPAC-2015 в исследуемых органах составило 2 – 3 ч (табл. 2).

Максимальная концентрация (C_{max}) IPAC-2015 возрастала в ряду: мышцы — головной мозг — плазма крови — почки — печень — селезенка (13,65; 71,79; 111,46; 132,29; 438,15; 824,1 нг/г(мл), соответственно).

Анализ величин тканевой доступности (f_T) IPAC-2015 показал, что исследуемое ФВ наиболее интенсивно распределяется в хорошо васкуляризован-

ных органах (селезенка, печень, почки), и в значительно меньшей степени — в умеренно и слабо васкуляризованных органах (скелетные мышцы, головной мозг) (рис. 3).

Тканевая доступность IPAC-2015 в системе “печень — плазма крови” составила 2,99; “почки — плазма крови” — 0,87. Следует отметить, что тканевая доступность IPAC-2015 в таких органах, как селезенка была максимальной и составила 4,03, что в 1,3 раза выше по сравнению с органом, обеспечивающим элиминацию — печенью (2,99). Для скелетных мышц этот параметр равнялся 0,21. Для органа-мишени — головного мозга — f_T составила 0,63.

Анализ фармакокинетических параметров, характеризующих элиминацию изучаемого ФВ, позволяет заключить, что IPAC-2015 длительно выводится из организма животных, на что указывают значения периода полувыведения вещества ($t_{1/2el}$) из органов, которые составляют от 5,21 ч для селезенки и до 19,74 ч для скелетных мышц.

После однократного в/ж введения IPAC-2015 в дозе 30 мг/кг в суточной моче крыс неизменное соединение обнаружено в крайне незначительных количествах (в среднем $2,20 \cdot 10^{-4}$ % от введенной дозы), а в кале крыс в среднем обнаружено 0,57 % исходного соединения. Таким образом, за 1 сут с калом животных неизмененный IPAC-2015 выводится в незначительных количествах, что указывает на полное всасывание IPAC-2015 из ЖКТ экспериментальных животных.

ВЫВОДЫ

1. После однократного внутрижелудочного введения IPAC-2015 крысам в дозе 30 мг/кг это фармакологическое вещество определяется на протяжении 24 ч. Период полувыведения IPAC-2015 из плазмы крови после в/ж введения составил 11,11 ч.

2. Показано, что IPAC-2015 распределяется по органам и тканям неравномерно. Тканевая доступность в селезенке составила 4,79, в органе-мишени — головном мозге — 0,61.

Таблица 2. Фармакокинетические параметры IPAC-2015 в плазме крови и различных тканях крыс после однократного в/ж введения в дозе 30 мг/кг

Параметр	Органы и ткани					
	печень	почки	селезенка	головной мозг	мышцы	плазма крови
C_{max} (нг/мл)	438,15	132,29	824,10	71,79	13,65	111,46
T_{max} (ч)	2,0	2,0	3,0	2,0	3,0	2,00
$AUC_{0 \rightarrow t}$ (нг/мл(г) · ч)	2798,02	809,09	3768,23	588,05	195,06	934,33
k_{el} (ч ⁻¹)	0,1232	0,0833	0,1330	0,0777	0,0351	0,0624
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (нг/мл(г) · ч)	3013,43	1027,93	4024,88	716,13	365,07	1312,25
$AUC_{t \rightarrow \infty}$ (%)	7,14	21,29	6,38	17,89	46,57	28,80
$t_{1/2}$ (ч)	5,63	8,32	5,21	8,92	19,74	11,11
MRT (ч)	8,57	13,90	7,33	13,52	30,13	17,97
f_T	2,99	0,87	4,03	0,63	0,21	-

3. Установлено, что после однократного внутрижелудочного введения IPAC-2015 в дозе 30 мг/кг с суточной мочой выводится $2,2 \cdot 10^{-4}$ %, а с суточным калом 0,57 % неизмененного фармакологического вещества.

4. Абсолютная биодоступность соединения IPAC-2015 после однократного внутрижелудочного введения составила 27,54 %, что говорит о перспективе применения капсулированной лекарственной формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Агафонов, В. К. Пиотровский, *Хим.-фарм. журн.*, **25** (10), 16 – 19 (1991).

2. С. О. Бачурин, Г. Ф. Махаева, В. В. Григорьев и др., Патент РФ № 2016111157 (2016).
3. С. О. Бачурин, В. Б. Соколов, А. Ю. Аксиненко и др., Патент РФ № 2015146080 (2015).
4. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, Т. Л. Гарибова, *Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Издание: ФГБУ “НЦЭСМП” Минздравсоцразвития России, Часть 1, Глава 17, Москва (2012), 276 – 296.
5. В. И. Сергиенко, Р. Джеллифф, И. Б. Бондарева, *Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение*, Издательство РАМН, Москва (2003).

Поступила 26.06.19

PRECLINICAL PHARMACOKINETICS OF IPAC-2015: POTENTIAL DRUG FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

V. P. Zherdev¹, G. B. Kolyvanov¹, A. A. Litvin¹, O. G. Gribakina¹,
P. O. Bochkov¹, R. V. Shevchenko¹, and V. V. Grigor'ev²

¹ V. V. Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

² Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Severny proezd 1, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

Pharmacokinetics of IPAC-2015 (potential drug for the treatment of Alzheimer's disease) was studied in rats. After single intragastric administration at a dose of 30 mg/kg IPAC-2015 was detected over 24 h. The half-life of IPAC-2015 was 11 h. It was established that tissue availability (f_T) of IPAC-2015 in well-vascularized organs (liver, spleen, kidney) was ten-fold higher than in skeletal muscles of rats. In the target organ (brain) f_T was 0.61. The absolute bioavailability of IPAC-2015 upon intragastric administration in rats amounted to 27.54 %.

Keywords: IPAC-2015; tissue availability; absorption; excretion; absolute bioavailability; high performance liquid chromatography-mass spectrometry; rats.