

ФАРМАКОКИНЕТИКА

ФАРМАКОКИНЕТИКА ГИМАНТАНА У КРЫС

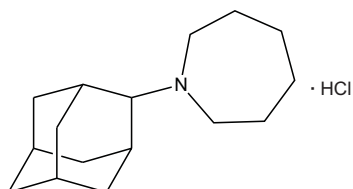
Е. А. Литвин, Д. В. Бастрыгин, Г. Б. Колыванов, К. В. Алексеев, В. П. Жердев¹

На крысах изучена фармакокинетика гимантана после введения разными способами. Показано, что после введения внутрь и внутривенного введения гимантан подвергается интенсивной биотрансформации с образованием основных метаболитов с m/z 250 и m/z 266, которые определяются в плазме крови животных в течение 6 ч. Установлено, что гимантан обладает высокой интенсивностью проникновения в орган-мишень — мозг, в то время как метаболиты отличаются крайне низкой проникающей способностью. Абсолютная биодоступность гимантана после введения внутрь составила 14,1%. Препарат подвергается эффекту первого прохождения. В неизменном виде исходное соединение определялось в моче и фекалиях в чрезвычайно малых количествах от введенной дозы: 0,23 % — в моче и 0,08 % — в фекалиях после внутривенного введения; 0,02 % в фекалиях после введения внутрь, вследствие чего можно сделать заключение о том, что препарат полностью всасывается из желудочно-кишечного тракта в системный кровоток.

Ключевые слова: экспериментальная фармакокинетика, гимантан, метаболиты, абсолютная биодоступность

ВВЕДЕНИЕ

В НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН разработано потенциальное противопаркинсоническое средство гимантан — N-(2-адамантил) гексаметиленмина гидрохлорид [2, 3].



Цель исследования — изучение фармакокинетики гимантана у крыс после его введения внутрь и внутривенного введения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали гимантана гидрохлорид (опытная партия 597), синтезированный в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова, трамадола гидрохлорид, “Словакофарма” (SN 3360404, Словакия), воду “для ВЭЖХ” (“Merck”, ФРГ), ацетонитрил “сверхчистый для масс-спектрометрии” (“Merck”, ФРГ). Все остальные реагенты имели квалификацию “ч.д.а.”.

Изучение фармакокинетики гимантана после введения внутрь и в вену проводили на белых крысах-самцах (масса тела 200 ± 20 г), полученных из питомника “Столбовая” РАМН. Животных содержали в стандарт-

ных условиях вивария НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН при 12-часовом световом режиме. За 12 ч до эксперимента животных лишали корма. Животных содержали в индивидуальных клетках, обеспечивающих сбор суточной мочи и фекалий отдельно друг от друга.

Животным однократно вводили водный раствор гимантана в дозе 25 мг/кг внутривенно и 50 мг/кг внутрь. Пробы крови отбирали до введения препарата (контроль) и в дискретные моменты времени: 0,05, 0,1, 0,16, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6 ч для внутривенного введения и 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 ч для введения внутрь. На каждый момент времени использовали по 8 животных.

Полученные декапитацией животных образцы крови центрифугировали (4000 об/мин в течение 15 мин) с целью получения плазмы крови. Мочу и фекалии крыс собирали в течение 24 ч после однократного внутривенного введения и введения препарата внутрь в дозе 25 мг/кг.

Извлечение гимантана из плазмы крови проводили путем осаждения белков плазмы ацетонитрилом. В центрифужную пробирку вносили 0,45 мл плазмы крови, добавляли 1,5 мл ацетонитрила и 0,05 мл водного раствора (50 нг/мл) внутреннего стандарта (трамадола гидрохлорид) и центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об/мин. Супернатант отделяли и аликвоту (15 мкл) вводили в петлю хроматографа.

Мозг отмывали физиологическим раствором от крови. 1 г мозга измельчали и гомогенизировали в 1 мл физиологического раствора с добавлением 0,5 мл 96 % этилового спирта (пеногаситель) в электрогомо-

¹ Лаборатория фармакокинетики (руководитель — проф. В. П. Жердев) НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

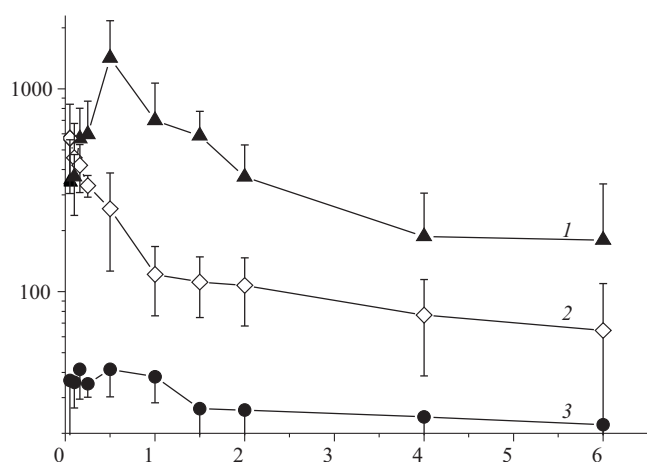


Рис. 1. Фармакокинетические кривые метаболита гимантана с m/z 266 (1), неизмененного гимантана (2), метаболита гимантана с m/z 250 (3) в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения препарата в дозе 25 мг/кг.

По оси абсцисс — время, ч, по оси ординат — логарифм концентраций, нг/мл ($n = 8$; $x \pm SD$).

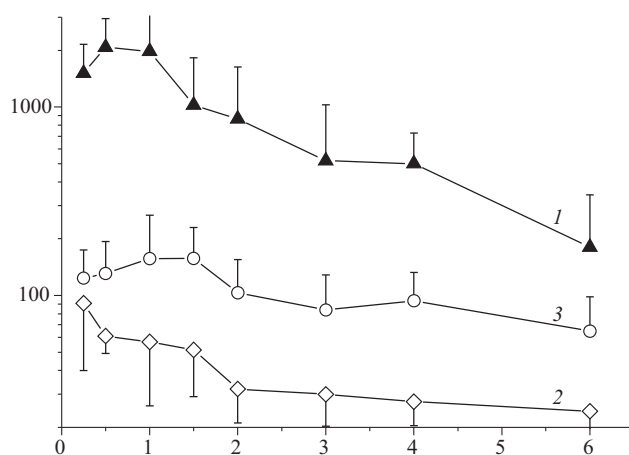


Рис. 2. Фармакокинетические кривые метаболитов гимантана с m/z 266 (1), m/z 250 (2) и неизмененного гимантана (3) в плазме крови крыс после однократного введения препарата внутрь в дозе 50 мг/кг.

По оси абсцисс — время, ч, по оси ординат — логарифм концентраций, нг/мл ($n = 8$; $x \pm SD$).

генизаторе. Смесь центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об/мин. Супернатант отделяли и аликвоту (15 мкл) вводили в петлю хроматографа.

К 1 мл опытных образцов мочи добавляли 0,2 мл 2 М раствора КОН и экстрагировали 20-кратным объемом диэтилового эфира в течение 15 мин на электрическом встряхивателе. Экстракцию проводили дважды. Эфирный экстракт отбирали и упаривали в токе азота. Сухой остаток растворяли в 1 мл ацетонитрила, в инжектор хроматографа вводили 15 мкл аликвоты.

Для количественного определения гимантана и его метаболитов в плазме крови животных использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС) на хроматографе “Agilent Technologies” серии 1200 (США).

Условия хроматографирования

Аналитическая колонка Zorbax 300SB (“Agilent”, США) C_{18} – 150 × 2,1 мм, диаметр частиц — 5 мкм. Подвижная фаза: раствор А и раствор В в соотношении 4:1. Раствор А: 25 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 2,5 мл концентрированной муравьиной кислоты, разведенные в 0,5 л воды. Раствор В: 25 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 2,5 мл концентрированной муравьиной кислоты, разведенные в 0,5 л ацетонитрила. Скорость потока подвижной фазы — 0,4 мл/мин. Скорость подачи азота — 12 л/мин, температура испарителя 350 °С, детектирование проводили в режиме позитивной ионизации по полному ионному току. Хроматографический анализ проводили при комнатной температуре (22 – 24 °С). Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане и фильтровали.

Количественное определение препарата и его метаболитов проводили методом внешних стандартов и

методом внутреннего стандарта. Линейность методик оценивалась по 8 калибровочным стандартам (2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 нг/мл), растворенным в элюенте, используя алгоритм линейной регрессии наименьших квадратов в системе координат “отношение площади хроматографического пика гимантана к площади хроматографического пика внутреннего стандарта — концентрация гимантана” и “площадь хроматографического пика — концентрация гимантана” для внешнего стандарта соответственно. В изучаемом диапазоне концентраций (С) отмечена линейная зависимость между концентрациями анализируемых соединений и соответствующих площадей пиков, которая описывалась следующим уравнением для калибровки по внешнему стандарту: $S = -2,95 \cdot 10^6 + 0,6729 \cdot 10^6 \cdot C_x$ ($r = 0,9998$), где S_x — площадь хроматографического пика гимантана. Либо $S_x/S_{вн.ст} = -0,214 \cdot 10^6 + 0,027 \cdot 10^6 \cdot C_x$, где $S_x/S_{вн.ст}$ — отношение площади хроматографического пика гимантана к площади хроматографического пика внутреннего стандарта. Концентрации метаболитов гимантана рассчитывали по калибровочной кривой неизмененного соединения.

В этих условиях время удерживания составило, соответственно, для гимантана — 4,7 мин, для метаболита m/z 266 – 3,2 мин, для метаболита m/z 250 – 3,7 мин. Время удерживания внутреннего стандарта составило 3,2 мин.

Предел чувствительности разработанной методики как для неизмененного препарата, так и для метаболитов составил 1 нг/мл.

Основные фармакокинетические параметры лекарственного вещества (ЛВ) и его метаболитов рассчитаны модельно-независимым методом:

$AUC_{0-\infty}$ (нг/мл · ч) — площадь под фармакокинетической кривой (площадь под кривой “концентрация

Таблица 1. Фармакокинетические параметры гимантана в плазме крови и мозге крыс после его однократного внутривенного введения в дозе 25 мг/кг

Исходное соединение, метаболиты	Фармакокинетические параметры						
	$AUC_{0-\infty}$, нг/мл · ч	C_0 , нг/мл	T_{max} , ч	C_{max} , нг/мл	k_{el} , ч ⁻¹	$t_{1/2el}$, ч	MRT , ч
Гимантан, плазма крови	774,65	1806,0	–	–	0,342	2,03	2,95
Метаболит m/z 250, плазма крови	165,18	–	0,1	41,31	0,149	4,64	6,90
Метаболит m/z 266, плазма крови	2375,81	–	0,5	1419,5	0,406	1,93	2,73
Гимантан, мозг	1766,84	–	0,05	5319,0	0,536	1,29	1,50

лекарственного вещества — время”) после введения в вену и введения внутрь. $AUC_{0-\infty}$ рассчитывается от момента введения до бесконечности; C_0 (нг/мл) — концентрация препарата в плазме крови после внутривенного введения в нулевой момент времени; T_{max} (ч) — время достижения максимальной концентрации препарата в плазме крови после введения внутрь; $t_{1/2}$ — время, за которое концентрация препарата в плазме крови снижается вдвое; C_{max} (нг/мл) — максимальная концентрация ЛВ в плазме крови после введения внутрь; C_{max}/AUC (ч⁻¹) — параметр, характеризующий скорость всасывания препарата в системный кровоток; MRT (ч) — среднее время пребывания ЛВ в организме; k_{el} (ч⁻¹) — константа скорости элиминации, параметр, характеризующий скорость выведения препарата из организма; $t_{1/2el}$ (ч) — период, за который выводится половина введенной и всосавшейся дозы ЛВ [6].

f_T — тканевая доступность, рассчитывается по формуле:

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

где $AUC_{T0-\infty}$ — AUC в ткани, $AUC_{p0-\infty}$ — AUC в плазме крови; f_a — абсолютная биодоступность, рассчитывалась по формуле:

$$f_a = \frac{AUC_{p0-\infty} \cdot D_{iv}}{AUC_{iv0-\infty} \cdot D_{po}} \cdot 100\%$$

где $AUC_{p0-\infty}$ — AUC в плазме крови после введения препарата внутрь, $AUC_{iv0-\infty}$ — AUC в плазме крови по-

сле внутривенного введения препарата, D_{iv} — введенная внутривенно доза, D_{po} — введенная внутрь доза.

$AUC_{m0-\infty}/AUC_{0-\infty}$ — степень превращения фармакологического вещества в метаболит, где $AUC_{m0-\infty}$ — площадь под фармакокинетической кривой метаболита; $AUC_{0-\infty}$ — площадь под фармакокинетической кривой исходного соединения [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В организме крыс гимантан подвергается выраженной биотрансформации. Методом ВЭЖХ–МС/МС в плазме крови животных наряду с неизменным препаратом идентифицировано (по молекулярным ионам) 2 метаболита, обозначенных в соответствии с отношением их молекулярной массы к заряду: m/z 250 и m/z 266. Поскольку молекулярный ион неизменного соединения характеризуется величиной m/z 234, можно предположить, что метаболит с m/z 250 представляет собой гидроксильрованную молекулу гимантана, а метаболит с m/z 266 — молекулу гимантана, гидроксильрованную в двух разных положениях.

Изучена фармакокинетика гимантана в плазме крови крыс после его внутривенного введения. При этом способе введения препарат и его метаболиты определяются в течение 6 ч. Снижение концентрации гимантана в крови носит ярко выраженный двухфазный характер (рис. 1, 2).

Исходное соединение подвергается интенсивной биотрансформации, уже на шестой минуте регистрируются оба метаболита, причем соединение с m/z 266 обладает большей AUC по сравнению с неизменным веществом в 3 раза (рис. 1, 1). Время достижения максимальной концентрации для метаболитов разли-

Таблица 2. Фармакокинетические параметры гимантана и его метаболитов в плазме крови крыс после однократного введения гимантана внутрь в дозе 50 мг/кг

Исходное соединение, метаболиты	Фармакокинетические параметры						
	$AUC_{0-\infty}$, нг/мл · ч	T_{max} , ч	C_{max} , нг/мл	$C_{max}/AUC_{0-\infty}$, ч ⁻¹	k_{el} , ч ⁻¹	$t_{1/2el}$, ч	MRT , ч
Гимантан	219,03	0,25	91,11	4,166	0,198	3,63	5,38
Метаболит m/z 250	604,09	1,5	157,49	–	0,164	4,39	6,51
Метаболит m/z 266	4773,60	1,0	2077,34	–	0,412	1,68	2,44

чалось (0,1 ч для m/z 250 и 0,5 ч для метаболита m/z 266) (рис. 1, 1, 3).

К наиболее информативным фармакокинетическим показателям, характеризующим превращение исходных соединений в метаболиты, относится степень превращения фармакологического вещества в метаболит. Степень превращения гимантана в метаболит m/z 250 характеризуется величиной 0,21, а в метаболит m/z 266 – 3,07. Таким образом, гимантан после внутривенного введения в значительно большей степени метаболизируется с образованием основного метаболита m/z 266, в меньшей степени — m/z 250.

Препарат и его производное с m/z 266 быстро выводятся из организма. Так, период полуэлиминации неизменного препарата составил 2,03 ч (MRT — 2,95 ч) и метаболита m/z 266 – 1,29 ч (MRT — 2,73). В то же время метаболит с m/z 250 элиминируется из плазмы крови животных более чем в два раза медленнее по сравнению с неизменным соединением. Его $t_{1/2el}$ составил 4,64 ч (MRT — 6,90 ч).

Рассчитанные фармакокинетические параметры представлены в табл. 1.

Анализ абсолютных величин концентраций гимантана и его метаболитов показал, что данные величины достоверно различались при $p = 0,95$, а в некоторых биологических образцах величины концентраций m/z 266 превышали таковые исходного соединения.

Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) препарата в мозге составило 0,05 ч, а ее величина — 5319 нг/мл. MRT и $t_{1/2el}$ гимантана в мозге значительно меньше аналогичных параметров, рассчитанных по плазме крови после внутривенного введения (1,29 и 1,5 ч против 2,03 и 2,95 ч соответственно).

Рассчитанная величина тканевой доступности (f_T) гимантана в мозге составила 2,28. Из полученных данных следует, что гимантан обладает высокой интенсивностью проникновения в орган-мишень — мозг [4].

Фармакокинетика гимантана после его введения внутрь крысам существенно отличается от кинетики внутривенного введения, прежде всего более низкими концентрациями неизменного препарата и абсолютной величиной площади под фармакокинетической кривой. AUC гимантана после введения внутрь в 3,5 раза меньше, чем после внутривенного.

Гимантан подвергается интенсивной биотрансформации и уже в первые минуты в плазме крови крыс регистрируются значительные концентрации его метаболитов, которые определяются в течение 6 ч. Снижение концентраций препарата и метаболитов носят ярко выраженный двухфазный характер (рис. 2). Фармакокинетические параметры гимантана и его метаболитов после введения препарата внутрь представлены в табл. 2.

Время достижения максимальной концентрации неизменного соединения составило 0,25 ч, а ее вели-

чина 91,11 нг/мл (рис. 2). Фармакокинетический параметр, характеризующий скорость всасывания препарата из ЖКТ в системный кровоток ($C_{max}/AUC_{0-\infty}$) составил $0,416 \text{ ч}^{-1}$. Выведение неизменного гимантана из плазмы крови так же как и после внутривенного введения носит двухфазный характер. Для метаболитов отмечены разные времена достижения C_{max} (1,5 ч — для m/z 250 и 1 ч — для m/z 266).

Полученные результаты позволяют заключить, что гимантан и его метаболиты выводятся из организма с различными скоростями, на что указывают значения констант скорости элиминации из плазмы крови (k_{el}), которые составили для гимантана $0,198 \text{ ч}^{-1}$ и для метаболитов $0,164 \text{ ч}^{-1}$ (m/z 250) и $0,412 \text{ ч}^{-1}$ (m/z 266) соответственно. Полученные зависимости отражаются в величинах среднего времени удерживания препарата/метаболитов в организме — 5,38 ч для гимантана и для его метаболита m/z 250 – 6,51 ч, периода полувыведения препарата из организма — 3,63 ч для гимантана и для метаболита — 4,39 ч, соответственно. Однако MRT соединения с m/z 266 составляет 2,44 ч и время его полувыведения — 1,68 ч (табл. 2).

Степень превращения гимантана в метаболит m/z 250 характеризуется величиной 2,76, а в метаболит m/z 266 – 21,79. Таким образом, гимантан после введения внутрь в значительно большей степени метаболизируется с образованием основного метаболита m/z 266, в меньшей степени — m/z 250.

Сравнительный анализ величин степеней превращения гимантана в основные метаболиты показал, что препарат интенсивнее метаболизируется в продукт биотрансформации m/z 266 после введения внутрь (степень превращения гимантана в метаболит составляет 21,79). Степень превращения гимантана в этот метаболит равна 3,07 при внутривенном введении. Аналогичная закономерность характерна и для образования метаболита m/z 250: при введении внутрь степень превращения составляет 2,76, а при внутривенном — 0,21.

Таким образом, в данном случае очевиден эффект первого прохождения через печень при введении гимантана внутрь.

Высокие величины степеней превращения гимантана в метаболит m/z 266 свидетельствуют о том, что один из основных путей биотрансформации препарата заключается в окислении молекулы данного вещества.

При сравнении величин констант скорости элиминации гимантана после введения в вену и введения внутрь видно, что препарат выводится быстрее из организма животных после внутривенного введения (k_{el} после внутривенного введения больше k_{el} после введения внутрь в 1,7 раза), в то время как для метаболитов отмечается обратная зависимость. Известно, что в идеальном случае значения этого параметра, полученного при различных способах введения (на одном виде

животных), не должны значительно отличаться друг от друга. В нашем исследовании разницу в величинах k_{el} можно объяснить тем, что усредненные фармакокинетические кривые представляли собой набор отдельных точек, взятых у различных животных. В то же время величины концентраций гимантана в плазме крови крыс после внутривенного введения и введения внутрь на терминальных участках фармакокинетических кривых подвергали математической статистической обработке по одностороннему ANOVA-тесту. При этом достоверные различия выявлены не были. Следует также иметь в виду, что в случае внутривенного введения препарат подвергается, главным образом, процессу элиминации. В случае же введения внутрь, помимо процесса выведения препарата одновременно протекает фаза всасывания, что в конечном итоге сказывается на продолжительности пребывания лекарственного вещества в организме животных.

Таким образом, полученные результаты по изучению фармакокинетики гимантана после его внутривенного введения и введения внутрь позволяют заключить, что лекарственное вещество элиминирует из организма животных со средней скоростью и его можно отнести к группе препаратов со средней продолжительностью пребывания в организме.

Абсолютная биодоступность гимантана после введения внутрь составляет 14,1 %.

Известно, что гимантан, подобно другим производным адамантана, интенсивно метаболизируется в организме [5]. Поэтому в неизменном виде исходное соединение определялось в моче и фекалиях в чрезвычайно малых количествах от введенной дозы после внутривенного введения (0,23 % — в моче и 0,08 % — в фекалиях). После введения внутрь гимантан практически полностью всасывается из желудочно-кишечного тракта крыс в портальный кровоток, что можно оценить по количеству ЛВ (процент от введенной дозы), обнаруживаемого в фекалиях (0,022 %). Препарат подвергается выраженному “эффекту первого прохождения” через печень.

Поскольку после внутривенного введения количество гимантана в фекалиях в 3,6 раз выше, чем после

введения внутрь, можно сделать заключение, что препарат полностью всасывается из желудочно-кишечного тракта в системный кровоток.

ВЫВОДЫ

1. После введения в вену и внутрь гимантан подвергается интенсивной биотрансформации, и уже в первые минуты в плазме крови и органах крыс регистрируются значительные концентрации его метаболитов. Гимантан и его метаболиты определяются в плазме крови животных в течение 6 ч.

2. Для гимантана характерна высокая степень проникновения в мозг (тканевая доступность равна 2,28).

3. Абсолютная биодоступность гимантана после введения внутрь составила 14,1 % относительно внутривенного введения.

4. Гимантан в неизменном виде выводится с мочой и фекалиями в чрезвычайно малых количествах: 0,23 % от введенной дозы — в моче и 0,08 % — в фекалиях после внутривенного введения; 0,02 % в фекалиях после введения внутрь, что говорит о почти полном всасывании препарата из желудочно-кишечного тракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств, В. В. Береговых (ред.), Литтерра, Москва (2008).
2. Е. А. Вальдман, Т. А. Воронина, Л. Н. Неробкова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **62**(4), 3 – 6 (1999).
3. Е. А. Вальдман, *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(5), 3 – 6 (2000).
4. А. О. Виглинская, Г. Б. Колыванов, А. А. Литвин и др., *Бюлл. экспер. биол.*, **143**(5), 528 – 530 (2007).
5. Е. С. Петренко, *Автореф. дис. канд. наук*, Москва (2003).
6. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), 2-изд., ОАО “Издательство “Медицина”, Москва (2005), сс. 217 – 229.

Поступила 04.04.11

PHARMACOKINETICS OF HEMANTANE IN RATS

E. A. Litvin*, D. V. Bastrygin, G. B. Kolyvanov, K. V. Alekseev, and V. P. Zherdev

Laboratory of Pharmacokinetics, Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences,

Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315, Russia

*e-mail: zlanomar@gmail.com

The pharmacokinetics of hemantane after administration in different ways has been studied in rats. It is established that hemantane introduced both orally (p.o.) and intravenously (i.v.) is very intensively metabolized, with the main metabolites characterized by $m/z = 250$ and 266 and detected for 6 hours after the administration in both ways. Hemantane shows high rate of permeability into its target organ – brain – whereas the permeation of its metabolites is extremely low. The absolute bioavailability of hemantane upon p.o. administration was 14.1%. The substance is subject to the “first-pass effect”. The unchanged substance was determined in daily urine and feces in very small fractions of the administered dose: 0.23% in urine and 0.08% in feces after i.v. administration and 0.02% in feces after p.o. administration. Thus, it may be concluded that the substance is completely absorbed in rats from the gastro-intestinal tract into systemic blood circulation.

Key words: Preclinical pharmacokinetics, hemantane, metabolites, absolute bioavailability