

ФАРМАКОКИНЕТИКА

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ 4-МЕТИЛ-2,6-ДИИЗОБОРНИЛФЕНОЛА В ТКАНЯХ И ОРГАНАХ КРЫС

В. И. Смольякова¹, Г. А. Чернышева¹, Е. А. Яновская¹, Р. В. Гурто¹,
А. В. Кучин², И. Ю. Чукичева², В. В. Удут¹, М. Б. Плотников^{1, 3}

Исследовано распределение нового соединения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в организме крыс после однократного внутрижелудочного введения в дозе 20 мг/кг. Оценка фармакокинетических параметров выполнена некомпартментным способом. Установлено, что 4-метил-2,6-диизоборнилфенол неравномерно распределяется в организме и имеет высокое сродство к тканям печени и сердца. Невысокое проникновение вещества было обнаружено в ткани мозга. Накопления ИБФ в жировой ткани не обнаружено. Показано, что 4-метил-2,6-диизоборнилфенол длительно элиминируется из организма, особенно из тканей сердца (MRT = 45 ч).

Ключевые слова: 4-метил-2,6-диизоборнилфенол; фармакокинетика; ВЭЖХ; распределение; абсорбция.

ВВЕДЕНИЕ

Фармакокинетические исследования являются обязательным этапом при создании новых лекарственных средств, основной практической задачей которых является оценка дозы препарата, способной поддерживать фармакологический эффект в течение определенного периода времени. Для решения поставленной задачи важным является изучение тканевого распределения новых лекарственных средств. Полученные результаты позволяют оценить скорость и степень проникновения вещества в ткани и органы, спрогнозировать побочные эффекты, возникающие вследствие его депонирования, а также эффективно подобрать режим дозирования препарата с учетом его избирательного накопления в тканях, органах и скорости выведения из организма во избежание токсических эффектов.

В данной работе представлены результаты изучения тканевого распределения нового полусинтетического соединения – 4-метил-2,6-диизоборнилфенола (ИБФ), обладающего широким спектром фармакологических эффектов: гемореологическим, антитромбоцитарным, противоишемическим и антиоксидантным [4 – 6].

Ранее нами показано, что ИБФ при внутривенном введении быстро распределяется в хорошо перфузируемые органы ($T_{1/2\alpha} = 0,4$ мин), имеет при внутрижелудочном введении невысокую биодоступность (12,2 %) и медленно выводится из организма (MRT = 9,1 ч после внутривенного введения) [9].

Целью исследования явилось изучение распределения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в тканях и органах крыс после однократного внутрижелудочного введения в дозе 20 мг/кг в крахмальной слизи.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 88 крысах-самцах Вистар массой 380 – 420 г, полученных в отделе экспериментальных биологических моделей ФГБУ “НИИ фармакологии им. Е. Д. Гольдберга” СО РАМН. Эксперименты на животных выполнены в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [10].

ИБФ вводили крысам однократно внутрижелудочно в виде взвеси в крахмальной слизи в дозе 20 мг/кг в объеме 1 мл. Отбор образцов крови проводили под эфирным наркозом через сонную артерию. Забор органов и тканей осуществляли после эвтаназии животных передозировкой эфирного наркоза. Органы и ткани (мозг, печень, почки, сердце, мышечную и жировую ткани) забирали через 1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24, 48, 72 и 96 ч после внутрижелудочного введения ИБФ (по 8 животных на точку). Извлеченные образцы промывали изотоническим раствором NaCl и высушивали на фильтровальной бумаге. После определения массы к каждому образцу прибавляли 1 мл дистиллированной воды и вызывали денатурацию белков термическим способом (30 мин на кипящей водяной бане). Затем денатурированные образцы гомогенизировали и из полученного гомогената экстрагировали ИБФ с помощью хлороформа. Для этого к пробам прибавляли хлороформ (5 мл на 500 мг ткани), интенсивно встряхивали в течение 20 мин и отделяли органическую фазу

¹ ФГБУ “НИИ фармакологии им. Е. Д. Гольдберга” СО РАМН, Томск, 634028, пр. Ленина, 3.

² ФГБУН Институт химии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167982, ул. Первомайская, 48.

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050, пр. Ленина, 36.

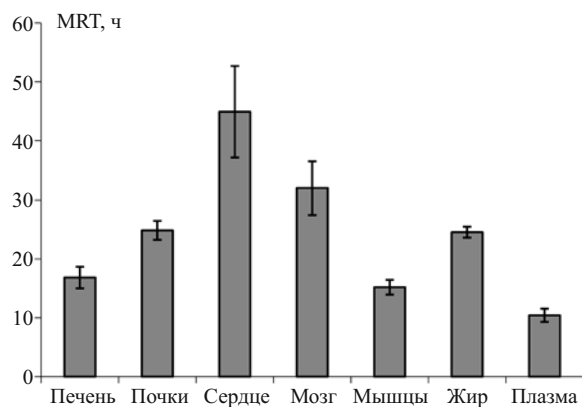


Рис. 1. Показатели среднего времени удерживания (MRT) в органах и тканях крыс после однократного внутрижелудочного введения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в дозе 20 мг/кг.

центрифугированием при 3000 мин^{-1} в течение 10 мин, после чего отбирали органический слой. Экстракцию хлороформом проводили дважды. Обе порции органической фазы соединяли и высушивали до суха в токе азота при температуре $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Сухой остаток растворяли в 300 мкл смеси гексан — изопропиловый спирт — ацетонитрил (3:5:2, v/v/v), фильтровали через фильтр 0,45 мкм (Millipore, Германия) и 5 мкл использовали для хроматографического анализа.

Количественный анализ проводили с использованием хроматографической системы LC-20 Prominence (Shimadzu) с флуориметрическим детектором и колонкой PerfectSil — 100 – 5-ODS $4,6 \times 250 \text{ мм}$. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил — вода в соотношении 95:5 (v/v), элюирование проводили в изократическом режиме со скоростью потока 100 мкл/мин. Количественное содержание ИБФ в биологических образцах определяли методом абсолютной калибровки. Для построения калибровочных кривых к интактным образцам добавляли раствор ИБФ в диапа-

зоне от 0,05 до 20 мкг/мл. Калибровочные кривые оценивали методом наименьших квадратов.

Оценку фармакокинетических параметров проводили внемоделным способом [1, 2, 7]. Коэффициент распределения ткань/кровь (K_p), определяющий средство соединения к тканям, оценивали как отношение $AUC_{\text{ткань}}/AUC_{\text{кровь}}$ [3].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel: рассчитывали среднее значение (\bar{X}), стандартную ошибку (SD) [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика средних концентраций ИБФ в тканях крыс после однократного внутрижелудочного введения в дозе 20 мг/кг представлена в табл. 1. ИБФ проникал в экстраваскулярные ткани всех исследованных органов и распределялся в организме неравномерно. Время достижения максимальных концентраций в тканях и органах варьировало в широком диапазоне от 3 до 24 ч.

Анализ концентраций во времени показал, что наиболее высокие значения ИБФ (22,81 мкг/г) достигались в печени через 6 ч после введения и превышали концентрацию в плазме в данной временной точке в 7 раз. Также высокий уровень концентраций ИБФ наблюдали в органе-мишени вещества — сердце, при этом время достижения максимальной концентрации (5,18 мкг/г) в сердце составило 4 ч.

В жировой ткани в течение первых 6 ч наблюдали низкий уровень концентраций ИБФ, интенсивное накопление начиналось только с 8 ч. Максимальную концентрацию в жировой ткани (3,61 мкг/г) определяли через сутки, что, возможно, связано с медленным перераспределением вещества из других органов.

Несмотря на то, что ИБФ является липофильным соединением и имеет соотношение $\log P_{\text{октанол/вода}} = 8,14$, его проникновение в мозг было незначительным.

Таблица 1. Концентрация 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в тканях и органах крыс (мкг/г, $\bar{X} \pm SD$)

Ткани, органы	Концентрация, мкг/г									
	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	16 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Печень	2,60 ± 0,86	5,05 ± 1,45	13,93 ± 3,37	16,45 ± 4,38	22,81 ± 12,69	18,13 ± 7,00	17,05 ± 4,68	6,74 ± 4,44	1,12 ± 0,50	0,25 ± 0,14
Сердце	1,29 ± 0,76	2,42 ± 0,75	4,06 ± 0,61	5,18 ± 1,42	3,61 ± 1,29	3,41 ± 1,04	3,10 ± 1,68	1,73 ± 1,22	1,69 ± 0,55	0,81 ± 0,53
Мозг	0,59 ± 0,19	0,68 ± 0,36	1,43 ± 0,83	1,11 ± 0,49	0,90 ± 0,32	0,73 ± 0,33	0,72 ± 0,47	0,35 ± 0,20	0,21 ± 0,07	0,12 ± 0,05
Почки	0,48 ± 0,24	0,50 ± 0,46	0,54 ± 0,21	0,71 ± 0,67	0,73 ± 0,63	1,36 ± 0,80	3,29 ± 0,75	1,95 ± 0,79	0,50 ± 0,11	0,11 ± 0,04
Мышцы	0,67 ± 0,38	0,89 ± 0,68	0,88 ± 0,73	1,07 ± 0,59	1,02 ± 0,73	2,19 ± 1,17	2,48 ± 1,83	0,17 ± 0,08	0,11 ± 0,04	0,00 ± 0,00
Жир	0,10 ± 0,05	0,12 ± 0,04	0,18 ± 0,08	0,23 ± 0,13	0,27 ± 0,17	0,50 ± 0,10	1,30 ± 0,41	3,61 ± 1,01	0,13 ± 0,08	0,07 ± 0,02
Плазма	2,07 ± 0,58	2,42 ± 0,63	2,64 ± 0,59	3,31 ± 0,32	3,32 ± 0,49	2,56 ± 0,80	0,97 ± 0,08	0,41 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

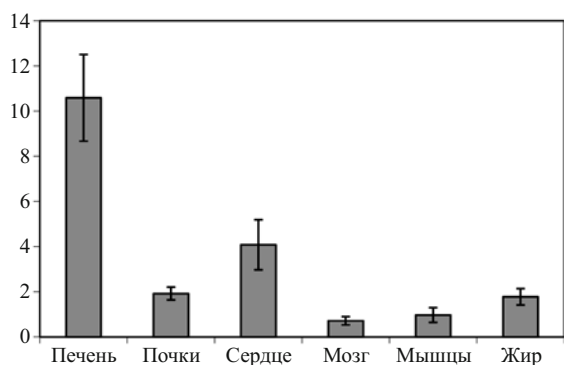


Рис. 2. Показатели коэффициента тканевого распределения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола для органов и тканей после однократного внутривенного введения в дозе 20 мг/кг.

Максимальная концентрация достигалась быстрее, чем в других органах (к 3 ч), но была меньше максимальной концентрации в плазме в 3 раза и составляла 1,43 мкг/г.

Процесс накопления ИБФ в тканях почек и мышц был медленным и после внутривенного введения максимальные концентрации (3,29 и 2,48 мкг/г соответственно) достигались только к 16 ч. Таким образом, в порядке убывания максимальных концентраций ИБФ ($\bar{X} \pm SD$, мкг/г) ткани и органы крыс можно расположить в следующей последовательности: печень ($22,81 \pm 12,69$) > сердце ($5,18 \pm 1,42$) > жировая ткань ($3,61 \pm 1,01$) > плазма ($3,32 \pm 0,49$) > почки ($3,29 \pm 0,75$) > мышцы ($2,48 \pm 1,83$) > мозг ($1,43 \pm 0,83$).

Установлено, что ИБФ длительно выводится из организма. Из данных, представленных на рис. 1, следует, что наиболее медленно ИБФ выводится из миокарда со средним временем удерживания 45 ч. Даже на 3 сут после введения в сердце, в сравнении с другими органами, определялись наиболее высокие концентрации (0,81 мкг/г), превышающие концентрацию в печени в 4 раза. Несмотря на то, что средний уровень ИБФ в мозге довольно низкий, процесс элиминации имел длительный характер со средним временем удерживания ИБФ 32 ч. Наиболее быстрый процесс выведения наблюдался из мышечной ткани ($MRT = 15$ ч), где в отличие от других исследуемых тканей, ИБФ не обнаруживался уже на 3 сут. По среднему времени удерживания вещества органы можно расположить в следующем порядке ($\bar{X} \pm SD$, ч): сердце ($44,90 \pm 7,76$) > мозг ($31,97 \pm 4,51$) > почки ($24,85 \pm 1,61$) > жир ($24,54 \pm 0,93$) > печень ($16,84 \pm 1,83$) > мышцы ($15,20 \pm 1,25$).

Одним из важных показателей при изучении тканевого распределения является коэффициент распределения, характеризующий степень проникновения ИБФ в ткани организма. Судя по коэффициентам тканевого распределения видно, что наибольшее накопление ИБФ наблюдалось в печени (рис. 2). Коэффициент распределения для печени превышал тот же показатель для почек в 5 раз, свидетельствуя о преимущественном выведении вещества из организма с желчью. Высокое значение коэффициента распределения в сердце (4,08) свидетельствует об избирательном захвате вещества из кровяного русла, что подтверждается его фармакологическим эффектом, так как ИБФ обладает выраженным кардиопротекторным действием.

Для многих липофильных препаратов (ионол, бутилгидроксианизол) характерно аккумулятивное в жировой ткани [11]. При исследовании ИБФ мы наблюдали в жировой ткани медленный рост концентраций ($t_{max} = 24$ ч), с интенсивным выведением вещества в течение 2 сут. Длительная элиминация ($MRT = 25$ ч) наблюдалась для незначительного количества, не превышающего 0,03 % от дозы (48 ч). Коэффициент тканевого распределения для жировой ткани был меньше в 6 раз по сравнению с печенью. Низкая степень проникновения ИБФ в мозг и мышечную ткань подтверждается коэффициентами распределения, значение которых не превышало 1 и составило 0,71 и 0,97 соответственно.

При расчете общего количества ИБФ, содержащегося во всех исследуемых органах и тканях, установлено, что через 6 ч (t_{max} в плазме, в печени) после введения суммарное количество ИБФ составило 6,71 % от дозы, причем основная доля соединения приходилась на плазму, печень и мышечную ткань (табл. 2). Однако максимальное содержание (8,6 % от дозы) наблюдалось к 16 ч после введения, когда наибольшее количество вещества содержалось в печени, мышечной и жировой тканях. Медленный рост суммарного количества ИБФ в последующие периоды наблюдения предположительно связан с продолжением процесса всасывания в ЖКТ, но менее активного, чем в первые часы после введения.

Таким образом, фармакокинетическое исследование нового соединения позволяет предполагать наличие феномена активного захвата ИБФ клетками миокарда. Результаты исследования подтверждают перспективность создания на основе 4-метил-2,6-диизоборнилфенола кардиопротекторного лекарственного средства пролонгированного действия.

Таблица 2. Суммарное количество 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в исследуемых органах и тканях после однократного внутривенного введения в дозе 20 мг/кг ($n = 8$, $\bar{X} \pm SD$)

Показатель	Время, ч										
	1	2	3	4	6	8	16	24	48	72	96
% от дозы	2,29 ± 0,73	2,91 ± 0,93	4,75 ± 1,24	5,68 ± 1,07	6,71 ± 1,97	8,13 ± 2,29	8,60 ± 3,16	2,76 ± 0,98	0,54 ± 0,11	0,09 ± 0,03	0,02 ± 0,01

ВЫВОД

4-Метил-2,6-диизоборнилфенол в организме крыс после однократного внутривенного введения в дозе 20 мг/кг неравномерно распределяется в ткани и органы. Наиболее высокие значения коэффициента тканевого распределения определены для печени и сердца (10,67 и 3,93 соответственно). Обнаружен низкий уровень концентраций в тканях мозга (1,43 мкг/г) и медленное перераспределение ИБФ из других органов в почки, в мышечную и жировую ткани. Суммарное максимальное количество ИБФ в исследуемых органах и тканях составило 8,60 % от дозы к 16 ч после введения. Показано, что ИБФ медленно элиминируется из организма, наиболее длительное выведение наблюдалось из тканей сердца (MRT = 45 ч).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Агафонов, В. К. Пиотровский, *Хим.-фарм. журн.*, **25**(10), 16 – 19 (1991); *Pharm. Chem. J.*, **25**(10), (1991).
2. Н. Н. Каркищенко, В. В. Хоронько, С. А. Сергеева, В. Н. Каркищенко, *Фармакокинетика*, Феникс, Ростов-на-Дону (2001).
3. И. И. Мирошниченко, *Основы фармакокинетики*, ГЭОТАР-МЕД, Москва (2002).
4. М. Б. Плотников, В. И. Смольякова, И. С. Иванов и др., *Бюл. экпер. биол. и мед.*, **145**(3), 296 – 298 (2008).
5. М. Б. Плотников, Г. А. Чернышева, В. И. Смольякова и др., *Вестник Рос. академии мед. наук*, № 11, 12 – 17 (2009).
6. М. Б. Плотников, В. И. Смольякова, И. С. Иванов и др., *Бюл. экпер. биол. и мед.*, **149**(6), 660 – 662 (2010).
7. В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева, Р. Джеллифф, *Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение*, Изд. РАМН, Москва (2003).
8. В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева, *Математическая статистика в клинических исследованиях*, ГЭОТАР-МЕД, Москва (2001).
9. Г. А. Чернышева, В. И. Смольякова, М. Б. Плотников и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **74**(9), 20 – 22 (2011).
10. *European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*, ETS № 123, Strasbourg (1986).
11. H. B. S. Conacher, F. Iverson, P.-Y. Lau, B. D. Page, *Fd. Chem. Toxic.*, **24**(10/11), 1159 – 1162 (1986).

Поступила 22.04.14

DISTRIBUTION OF 4-METHYL-2,6-DIISOBORNILPHENOL IN RAT TISSUES

V. I. Smol'yakova¹, G. A. Chernisheva¹, E. A. Yanovskaya¹, R. V. Gurto¹, A. V. Kuchin², I. Yu. Chukicheva², V. V. Udu¹, and M. B. Plotnikov^{1,3}

¹ E. D. Gol'dberg Institute of Pharmacology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, pr. Lenina 3, Tomsk, 634028 Russia

² Institute of Chemistry, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Pervomaiskaya 48, Syktyvkar, Komi Republic, 167982 Russia

³ Laboratory of Phytochemistry and Experimental Pharmacology, Tomsk State University, pr. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

We have studied the distribution of the new compound 4-methyl-2,6-diisobornylphenol in rats after a single oral administration in a dose of 20 mg/kg. The pharmacokinetic parameters have been estimated by the noncompartmental method. It is established that the drug is nonuniformly distributed in the body and has a high affinity for liver and heart. A low penetration of 4-methyl-2,6-diisobornylphenol has been found in brain tissue. The accumulation of 4-methyl-2,6-diisobornylphenol in adipose tissues has not been found. It been showed that the drug is slowly eliminated from the body, especially from the heart tissues for which the mean retention time is MRT = 45 h.

Keywords: 4-methyl-2,6-diisobornylphenol; pharmacokinetics; HPLC; distribution; absorption.