

О. К. Ярош¹, О. О. Нагорна², Л. І. Кучеренко³, О. С. Бідненко³

Параметри фармакокінетики таблеток «Ангіолін» у крові щурів після перорального введення

¹ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

²Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ

³НПО «Фарматрон», м. Запоріжжя

Ключові слова: таблетки «Ангіолін», кров, фармакокінетика, математичне моделювання

Патологія серцево-судинної системи залишається основною причиною смертності населення як у світі, так і в нашій країні. Тому пошук нових, сучасних, ефективних вітчизняних ліків є актуальною проблемою медицини та має велике соціально-економічне значення.

Пошук ефективних серцево-судинних засобів здійснюється серед нових хімічних сполук, а також на основі поглибленого вивчення й з'ясування нових механізмів уже відомих препаратів, що добре себе зарекомендували тривалою клінічною практикою. У таких клінічно перевірених активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) знаходять нові властивості, зокрема завдяки хімічному докінгу та зміні фармакокінетичного дизайну. Завдяки саме такому підходу створено нову сполуку – лізіній 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтової кислоти («Ангіолін»), синтезовану в НВО «Фарматрон» під керівництвом заслуженого діяча науки і техніки України, професора І. А. Мазура. «Ангіолін» є сіллю (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату, утвореною між лужною амінокислотою лізином та 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтовою кислотою [1–3]. Сполуку планується застосовувати для терапії захворювань серцево-судинної групи, особливо при хронічній патології в формі таблеток, фармакокінетика якої при пероральному застосуванні невідома.

Мета дослідження – вивчення основних фармакокінетичних параметрів у крові активного фармацевтичного інгредієнта таблеток «Ангіолін» після перорального введення щурам.

Матеріали та методи. Проведення експериментів здійснювали на 75 щурах, вирощених у ПП «Біомодель-сервіс». 15 тварин використали для приготування бланкової крові в процесі налаштування методики, у 60 щурів відбирали кров у різні проміжки часу після перорального введення таблеткової маси. Досліджувану таблетмасу вводили перорально у вигляді 10 % суспензії в дозі 50 мг/кг маси тіла тварини в перерахунку на вміст АФІ препарату «Ангіолін». Проби крові відбирали після етаназії тварин під ефірним наркозом через 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 та 420 хв від початку введення досліджуваної таблетмаси.

Кількісне визначення субстанції препарату «Ангіолін» проводили за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з мас-спектрометричною детекцією на приладі фірми Agilent Technologies 1200 (США). Розпізнавання АФІ препарату «Ангіолін» здійснювали одноквадрупольним мас-спектрометром з електроспрей-іонізацією за відомими методичними прийомами, які широко використовуються в експериментальній та клінічній фармакокінетиці [4–7]. Хроматографічне розділення здійснювали з використанням двох аналітичних колонок Rapid Resolution HT Cartridge 4,6×30 мм 1,8 мкм Zorbax SB-C18 та Agilent XDB-C18 4,6×50 мм 1,8 мкм, з'єднаних послідовно, для підвищення чутливості та відповідності показників валідаційного тестування до вимог статей ДЕЦ, ДФУ та ЕМЕА [8–10]. Валідацію методики здійснювали за показниками ефекту матриці, специфічності, стабільності, верхньої та нижньої межі кількісного визначення, правильності (внутрішньо- та міжпрогонної), збіжності, ступеня вилучення.

Підготовку проб крові здійснювали шляхом вилучення із сироватки крові АФІ препарату «Ангіолін». Для цього в пробірку типу «еппENDORF» вносили 0,8 мл сироватки, додавали 1 мл метанолу та ставили на 5 хв в ультразвукову баню при температурі 55 °С для повного осадження білково-ліпідних комплексів. Надосадову рідину центрифугували при 8000 об/хв протягом 30 хв, заміряли точний об'єм отриманого прозорого розчину і декантували в нову пробірку.

Для хроматографування по 2 мкл підготовлених біопроб крові, відібраних у різні періоди після введення таблетмаси, вносили до віал. Елюювання проводили в ізократичному режимі з наступним промиванням колонки. Як рухому фазу використовували суміш вода-ацетонітрил (9:1) з додаванням 0,5 % розчину мурашиної кислоти (фаза А). Промивання колонки здійснювали розчином ацетонітрилу з 0,5 % мурашиної кислоти (фаза В). Швидкість потоку становила 0,5 мл/хв при температурі 45 °С. Метод реєстрації – SIM Method (174 m/z). Фрагментор – 120, напруга на капілярі – 4000 В, температура газу – 250 °С, швидкість – 12 л/хв, тиск розпилювача – 35 psig. Час утримання АФІ «Ангіолін» реєстрували на 2,95–3,00 хв, загальна тривалість аналізу складала 10 хв (з урахуванням промивання колонки).

Дані експериментів піддавали статистичній обробці за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel та Statistica 6.0 з використанням t-критерію Стьюдента [11–13].

Результати та їх обговорення. При розробці методу та виконанні

обов'язкових процедур валідації для визначення адекватності знайденої процедури підготовки проб крові здійснювали побудову градууювального (калібрувального) графіка залежності площі хроматограм від концентрації досліджуваної сполуки. На рисунку 1 наведено графік поліноміальної залежності третього ступеня, побудований на основі зареєстрованих хроматограм калібрувальних розчинів АФІ препарату «Ангіолін». У дослідженні можливий рівень максимальної концентрації вибирали, виходячи з введеної дози та прогнозування можливої верхньої межі кількісного визначення (ВМКВ), з урахуванням дози, шляху введення, ймовірного ступеня руйнування речовини під впливом ферментів крові і т. ін. Виявили, що між площами отриманих піків та концентраціями відповідних розчинів сполуки в розробленому процесі підготовки біопроб крові кореляція була на рівні $K_{\text{кор}} = 0,9999$. Отриманий градууювальний графік за параметрами відповідав вимогам ДФУ.

Графік описують поліномом третього ступеня:

$$S = aC^3 + bC^2 + cC - d, \quad (I)$$

$$\text{де } a - 6,6725661414 \cdot 10^{-19};$$

$$b - 8,7576326420 \cdot 10^{-11};$$

$$c - 4,0059743077 \cdot 10^{-3};$$

$$d - 11,537250951;$$

C – концентрація АФІ препарату «Ангіолін», нг/мл;

S – площа піка АФІ препарату «Ангіолін» на хроматограмі,

$$\text{тобто } S = 6,6725661414 \cdot 10^{-19}C^3 + 8,7576326420 \cdot 10^{-11}C^2 + 4,0059743077 \cdot 10^{-3}C - 11,537250951$$

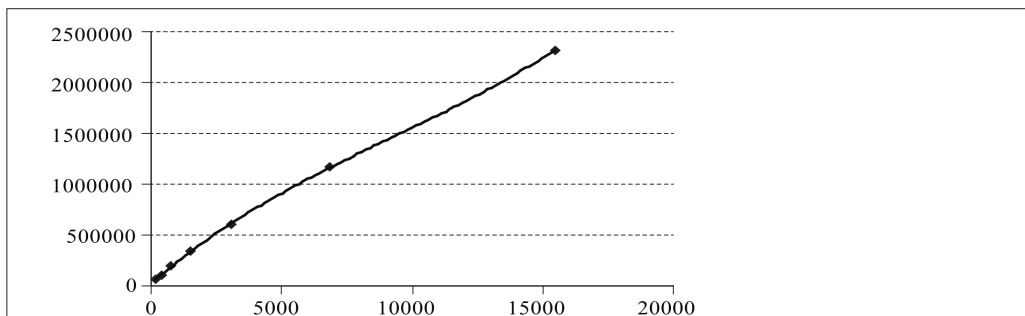


Рис. 1. Градууювальний графік залежності площі сигналу активного фармацевтичного інгредієнта таблеток «Ангіолін» від концентрації

На осі абсцис – концентрація АФІ в нг/мл, на осі ординат – площа під хроматограмою в умовних одиницях.

**Концентрація активного фармацевтичного інгредієнта
препарату «Ангіолін» (нг/мл) у сироватці крові щурів (n = 60)
після перорального введення таблеткової маси в дозі 50 мг/кг**

| | | Час після введення, хв | | | | | | | | | |
|-----|--------|------------------------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 15 | 30 | 45 | 60 | 90 | 120 | 180 | 240 | 300 | 360 | 420 |
| М | 1717,3 | 5879,6 | 2805,7 | 3818,1 | 917,2 | 1353,7 | 538,4 | 327,6 | 293,6 | 384,9 | 412,0 |
| ± m | 210,6 | 1613,6 | 407,5 | 942,7 | 243,6 | 393,8 | 83,4 | 101,7 | 11,7 | 56,1 | 135,9 |

За умов експерименту *in vivo* на щурах отримані результати визначення АФІ препарату «Ангіолін» та аналіз їх показав, що вже через 15 хв після перорального введення таблетмаси концентрація АФІ визначалася в сироватці крові на рівні $1717,3 \pm 210,6$ нг/мл сироватки (табл. 1).

Типові хроматограми при кількісному визначенні рівня АФІ препарату

«Ангіолін» у калібрувальних розчинах та крові, одержані з дотриманням умов, викладених у вимогах ДФУ та рекомендаціях ДЕЦ, GLP, FDA та ЕМЕА [7, 9, 10], наведено на рисунку 2.

Максимальну концентрацію АФІ таблеток «Ангіолін» у крові реєстрували через 30 хв після введення на рівні $5879,6 \pm 1613,6$ нг/мл. Однак уже на 45 хв після введення розпочи-

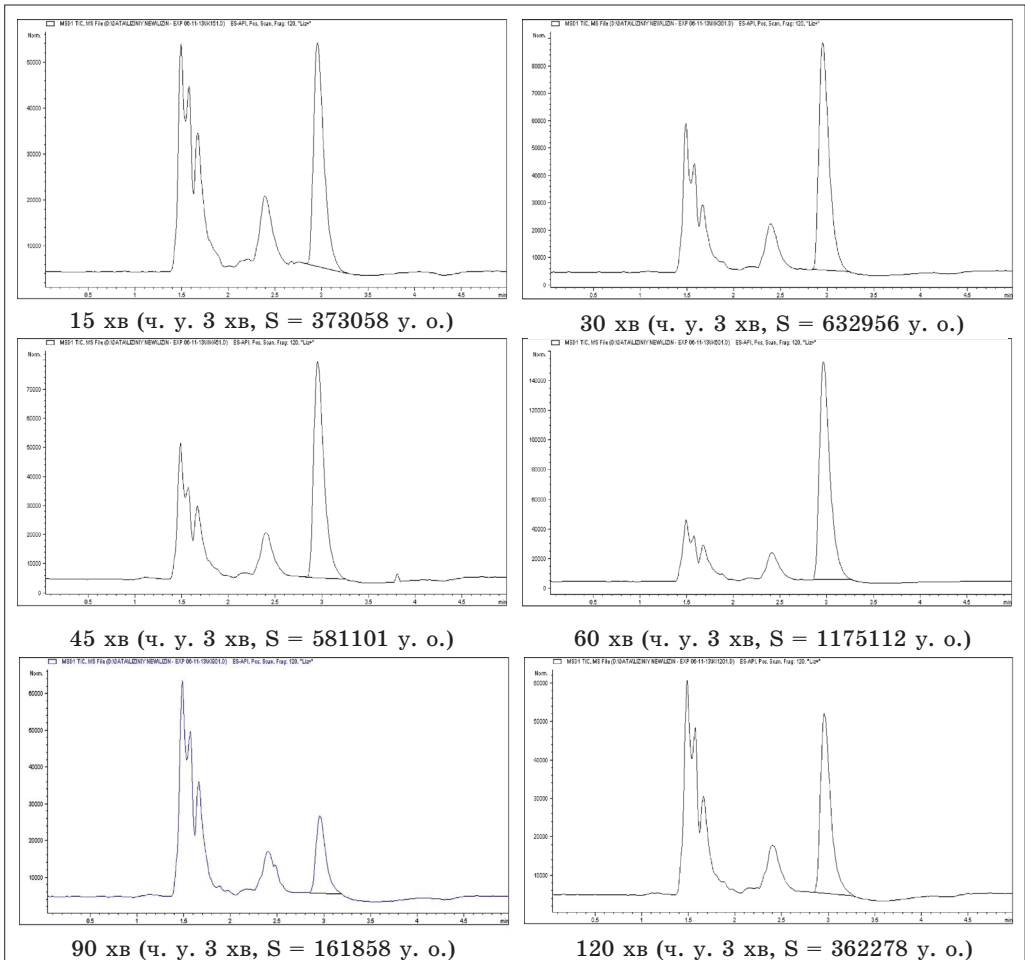


Рис. 2. Типові хроматограми АФІ таблеток «Ангіолін» (інтегровані) у крові щурів відповідно через 15, 30, 45, 60, 90 та 120 хв після перорального введення сполуки в дозі 50 мг/кг маси тіла

Примітка. ч. у. – час утримання АФІ таблеток «Ангіолін», хв; S – площа під хроматограмою, у. о.

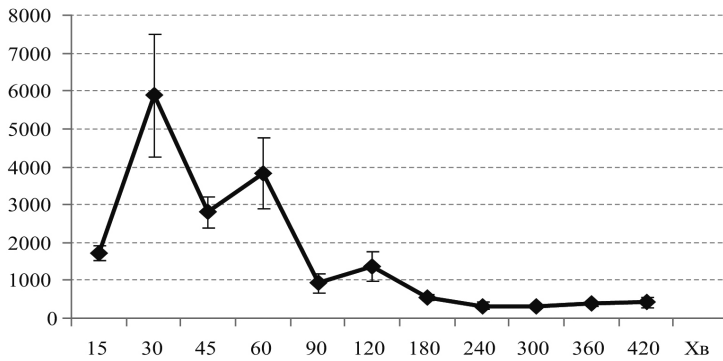


Рис. 3. Динаміка концентрації АФІ таблеток «Ангіолін» у крові щурів у різні періоди після його одноразового введення в дозі 50 мг/кг

Примітка. По осі абсцис – час після введення таблеток «Ангіолін», хв; по осі ординат – концентрація АФІ таблеток «Ангіолін», нг/мл.

налося зниження вмісту сполуки в крові, коли її концентрація падала більше ніж удвічі і становила $2805,7 \pm 407,5$ нг/мл. Через 60 хв після введення таблеткової маси спостерігали другий підйом концентрації активної сполуки препарату, але він виявився нижчим, ніж перший і досягав тільки $3818,1 \pm 942,7$ нг/мл.

Зниження вмісту препарату «Ангіолін» до показника майже нижньої межі визначення спостерігали на 90 хв. У цей період після введення таблеткової маси вміст досліджуваної субстанції реєстрували на рівні $917,2 \pm 243,6$ нг/мл. На відрітку часу від 120 хв до 420 хв концентрацію АФІ препарату «Ангіолін» реєстрували в межах $1353,7 \pm 393,8$ нг/мл до $293,6 \pm 11,7$ нг/мл. Наприкінці експерименту – 420 хв (7 год) після введення препарату вміст АФІ становив тільки $412,0 \pm 135,9$ нг/мл.

Таким чином, моніторинг концентрації активної сполуки таблеток «Ангіолін» у крові щурів показав, що досягнення її максимального накопичення в сироватці крові відбувалося на 30 хв експерименту і сягало $5879,6 \pm 1613,6$ нг/мл сироватки.

Натомість, розраховані параметри з використанням 2-часткової моделі зі всмоктуванням шляхом інтегрування експериментальних даних, отриманих у досліджах *in vivo* на щурах, з використанням математичної моделі «Vorgia» [5, 6, 9] дали змогу встановити інші параметри фармакокінетичного профілю АФІ таблеток «Ангіолін». Отримані результати представлено в таблиці 2.

Порівнюючи результати експериментальних досліджень з даними, отриманими при математичному моделюванні кінетичних параметрів, можна констатувати, що досить багато показників

Таблиця 2

Фармакокінетичні параметри активного фармацевтичного інгредієнта таблеток «Ангіоліну» у сироватці крові щурів після перорального введення в дозі 50 мг/кг за умов обрахування параметрів з використанням математичної моделі

| № | Параметр | Показники та їхня розмірність | Кров |
|---|------------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| 1 | Уявна початкова концентрація | C_0 (нг/мл) | $9,00 \pm 1,12$ |
| 2 | Максимальна концентрація препарату | C_{max} (нг/мл) | $6481,4 \pm 736,2$ |
| 3 | Уявний об'єм розподілу | V_d (мл/кг) | $3,11 \pm 0,29$ |
| 4 | Площа під фармакокінетичною кривою | AUC (нг/хв*мл) | $6111,3 \pm 714,2$ |
| 5 | Константа напівелімінації | K_{el} (хв ⁻¹) | $7537,5 \pm 871,7$ |
| 6 | Загальний кліренс | Cl_t (мкг/хв) | $771,9 \pm 86,5$ |
| 7 | Середній час перебування в крові | MRT (хв) | $179,7 \pm 59,8$ |

повністю або частково співпадають з отриманими в результаті проведених експериментів *in vivo*. Порівняння результатів реальних досліджень на щурах та віртуальних параметрів, розрахованих з використанням математичного моделювання, дає змогу застосовувати їх на певному етапі розвитку фармакокінетики. Сьогодні паралельне використання обох методів необхідне для накопичення достатнього фактичного матеріалу для збільшення точності математичного моделювання. Це дасть змогу максимально наблизити віртуальні результати до показників реальних біологічних експериментів. У майбутньому розвиток і впровадження таких досліджень принесе відчутну біотичну та економічну користь.

Висновки

1. Розроблена методика ВЕРХ з мас-спектрометричною детекцією для кількісного визначення активного фармацев-

тичного інгредієнта таблеток «Ангіолін» валідована та відповідає вимогам ДФУ та рекомендаціям ДЕЦ, GLP, FDA і ЕМЕА.

2. Після одноразового перорального введення таблеткової маси препарату «Ангіолін» щурам у дозі 50 мг/кг максимальна концентрація (C_{max}) активно-го фармацевтичного інгредієнта в крові за експериментальними результатами становить $5879,6 \pm 1613,6$ нг/мл, обрахована за математичною моделлю – $6481,4 \pm 736,2$ нг/мл.

3. Середній час перебування (MRT) у сироватці крові за даними експериментів на щурах становить 180 хв, коли концентрація АФІ препарату «Ангіолін» падає до рівня $538,4 \pm 83,4$ нг/мл, а при обрахуванні віртуальної математичної моделі – $179,7 \pm 59,8$ хв.

4. Показник кліренсу діючої речовини таблеток «Ангіолін» з крові щурів становить за експериментально-розрахунковими даними в середньому $771,9 \pm 86,5$ мкг/хв.

1. Метаболитотропные препараты / И. А. Мазур, И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев [и др.]. – Запорожье, 2007. – 309 с.
2. Мазур І. А. Патент України № 86668 № С07 D, А61К 31/41 «Лізиній 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтової кислоти, викликаючий нейропротективну, ноотропну, кардіопротективну, ендотеліотропну, протиішемічну, антиоксидантну, протизапальну, протигіпоксичну дію і маючу низьку токсичність / І. А. Мазур, Ю. М. Колесник, Л. І. Кучеренко, І. Ф. Беленічев та ін. Заявл. 04.06.2007. Опубл. 20.10.2009.
3. Мазур И. А. Патент РФ № 21370492 С07 D, А61К 31/41 «Лизиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислоты, проявляющий нейропротективное, ноотропное, кардиопротективное, эндотелиотропное, противоишемическое, антиоксидантное, противовоспалительное, противогипоксическое действие и обладающий низкой токсичностью / И. А. Мазур, Ю. М. Колесник, Л. И. Кучеренко, И. Ф. Беленичев и др. Заявл. 04.06.2007. Опубл. 20.10.2009.
4. Pharmacokinetic Optimization in Drug Research / В. Testa, Н. Waterbeemd, G. Folkers, R. Guy // Verlag Helvetica Chimica Acta. Zurich. – 2001. – 655 p.
5. Фармакокінетика / Н. Н. Каркищенко, В. В. Хоронько, С. А. Сергеева, В. Н. Каркищенко. – Ростов-на-Дону : «Феникс», 2001. – 384 с.
6. Методические рекомендации: Расчеты фармакокинетических параметров лекарственных средств (линейные частевые модели) / Н. Я. Головенко, О. В. Жук, В. Г. Зиньковский [и др.]. – К. : ГФЦ МЗ Украины, 2003. – 19 с.
7. Валідація біоаналітичного методу / Н. А. Жукова, В. В. Либина, И. В. Кудрис, Н. Н. Падалко // Методические рекомендации. – К. : ГП ГЭЦ, – 2013. – 35 с.
8. Лук'яничук В. Д. Введення до загальної фармакокінетики / В. Д. Лук'яничук, Д. С. Кравець. – Луганськ : ВАТ «ЛОТ», 2004. – 116 с.
9. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна Фармакопея України. ДП «Наук.-експертн. фармакоп. центр». 1-е вид. – Харків : PIPEГ, 2001. – Доп.1. – 2004. – С. 187–221.
10. Guideline on bioanalytical method validation / Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)/ЕМЕА/CHMP/EWP/19221/2009 // 21 July 2011. – 22 p.
11. Сернов Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л. Н. Сернов, В. В. Гацура. – М., 2000. – 345 с.
12. Гельман В. Я. Медицинская информатика: практикум / В. Я. Гельман. – СПб. : Питер, 2001. – 480 с.
13. Лапач С. Н. Статистика в науке и бизнесе / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2002. – 640 с.

А. К. Ярош, Е. А. Нагорная, Л. И. Кучеренко, О. С. Бидненко

Параметры фармакокинетики таблеток «Ангиолин» в крови крыс после перорального введения

Проведено исследование основных параметров фармакокинетики таблеток нового сердечно-сосудистого препарата «Ангиолин» в крови крыс с использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией. «Ангиолин» разработан НПО «Фарматрон», г. Запорожье. Разработана и валидирована методика определения активного фармацевтического ингредиента (АФИ) нового препарата таблеток «Ангиолин», соответствующая требованиям Государственной Фармакопеи Украины, Государственного экспертного центра МЗ Украины, рекомендациям GLP, FDA и EMEA. Установлены основные показатели времени достижения ($t_{\max} = 30$ мин) максимальной концентрации ($C_{\max} = 6481,4 \pm 736,2$ нг/мл), распределения ($V_d = 3,11 \pm 0,29$ мл/кг), среднего времени пребывания в крови ($MRT = 179,7 \pm 59,8$ мин) и клиренса неизменной фракции с мочой ($Cl = 771,9 \pm 86,5$ мкг/мин).

Анализируются и сравниваются показатели фармакокинетики таблеток «Ангиолин», полученные в эксперименте, и при математическом моделировании с использованием 2-частевой модели со всасыванием.

Установленные данные могут использоваться при составлении инструкции для клинических исследований с учетом определения необходимого дозирования для людей и подготовки досье к регистрации в ГЭЦ МЗ Украины.

Ключевые слова: таблетки «Ангиолин», кровь, фармакокинетика, математическое моделирование

А. К. Yarosh, H. A. Nagornaya, L. I. Kucherenko, O. S. Bidnenko

The pharmacokinetic parameter of the «Angiolin» tablets in rats blood after oral administration

To aim of this study was to evaluate the basic pharmacokinetic parameters of new cardiovascular drug «Angiolin» tablets in the blood of rats using HPLC with mass spectrometric detection. «Angiolin» was developed by the SPU «Farmatron» Zaporozhye. A new method for determination of the active pharmaceutical ingredient (API) of a new drug was designed in accordance to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine, State Expert Center MHC of Ukraine, GLP, the FDA and the EMEA recommendations.

The basic indicators of the time ($t_{\max} = 30$ min) maximum concentration achievement ($C_{\max} = 6481,4 \pm 736,2$ ng/ml), distribution ($V_d = 3,11 \pm 0,29$ ml/kg), the mean residence time in the blood ($MRT = 179,7 \pm 59,8$ min), and unmodified fractions with the clearance urine ($Cl = 771,9 \pm 86,5$ μ g/min) were established.

The kinetics parameters «Angiolin» in mathematical modeling using 2-piece body model with absorption were presented.

Comparative analysis of the values obtained in the experiment and calculations in mathematical virtual mathematical modeling of individual pharmacokinetic indicators were provided.

The obtained data can be used for guidelines for clinical trials using the definition of the required dosage for humans and preparing the data for registration in SEC.

Key words: pharmacokinetics, tablets «Angiolin», blood, mathematical modeling

Надійшла: 05.03.2014 р.

Контактна особа: Ярош Олександр Кузьмич, відділ фармакокінетики, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 98 65. Електронна пошта: yarosh44@mail.ru