

О. К. Ярош¹, О. О. Нагорна², Л. І. Кучеренко³,
А. В. Волуй¹, О. В. Кузнєцова¹

Кардіотропність нової ін'єкційної форми препарату «Ангіолін» після внутрішньом'язового 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: кардіотропність, препарат «Ангіолін», міокард, внутрішньом'язове введення, ВЕРХ

Пошук ефективних лікарських засобів терапії захворювань серцево-судинної системи (ССС) залишається вкрай актуальною проблемою. Щорічно в Україні діагностують близько 50 тис. випадків інфаркту міокарда, а внаслідок захворювання серця і судин умирає майже 460 тис. осіб [1].

Ефективність фармакологічної допомоги пацієнтам з патологією ССС значною мірою залежить, з одного боку, від особливостей фармакодинаміки препарату, а з іншого – від основних показників фармакокінетики (ФК), тобто шляхів досягнення таргетних клітин та тих змін, яких зазнає активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ) в організмі. Для препаратів серцево-судинної групи найважливішим з параметрів ФК є швидкість і повнота доставки АФІ препарату спочатку в кров, а потім – до цільових клітин (клітин-мішеней), зокрема, серця та судин організму [2–4].

У науково виробничому об'єднанні «Фарматрон» синтезовано новий препарат під умовною назвою «Ангіолін» та створено готову лікарську форму – ін'єкційний розчин в ампулах. При вивченні фармакодинаміки Ангіолін виявився найкращим за співвідношенням ефективність/безпечність серед багатьох представників групи кардіотоніків. Новий препарат показав дуже важливі позитивні властивості на різних моделях серцево-судинної недостатності [5, 6].

Як відомо, одним з найшвидших і найпоширеніших шляхів доставки АФІ до цільових тканин сьогодні є внутрішньовенний (в/в) та внутрішньом'язовий (в/м). Тому нова лікарська форма препарату «Ангіолін» у вигляді ін'єкційного розчину в ампулах для в/м введення в перспективі буде мати велике практичне значення для надання невідкладної лікарської допомоги при кризових станах ССС.

Мета дослідження – визначення параметрів кардіофармакокінетики АФІ ін'єкційного розчину «Ангіолін» за умов одноразового внутрішньом'язового (в/м) введення щурам.

Матеріали та методи. Дослідження здійснювали на 50 білих статевозрілих щурах обох статей масою 150–230 г, отриманих з ПП «Біомодельсервіс». Усі дослідження на тваринах проводили відповідно до національних та міжнародних вимог з біоетики. Препарат «Ангіолін» вводили одноразово в/м у вигляді 2,5 % розчину для ін'єкцій у дозі 50 мг/кг маси тіла в перерахунок на АФІ. Через 5, 10, 20, 40, 60, 120 та 180 хв після введення під ефірним наркозом забивали щурів та вилучали серце й готували біопроби з метою їхнього подальшого хроматографування за методикою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Для цього тканини серця заморожували, ретельно подрібнювали й готували тканинну біопробу для кількісного визначення вмісту в ній активного фармацевтичного інгредієнта. Вилучення АФІ з тканин серця здійснювали шляхом додавання до кожної проби 1 мл метанолу та ставили на 5 хв в ультра-

звукову баню і при температурі 55 °С здійснювали повне осаджування дрібнодисперсних часток з вивільненням з них досліджуваної сполуки. Проби центрифугували 30 хв при 8000 об/хв, а надосадовий прозорий розчин заміряли (точний об'єм) та переносили до віал для подальшого хроматографування.

Визначення концентрації сполуки «Ангіолін» здійснювали за допомогою ВЕРХ з мас-селективним детектуванням на приладі фірми «Agilent Technologies 1200 Series» (США).

Параметри налаштування мас-селективного детектора та валідації методу наведено в попередніх публікаціях [7]. Експериментальне визначення концентрації АФІ в тканинах серця проводили в повній відповідності до вимог національних та міжнародних керівництв [8, 9].

Отримані хроматограми АФІ ін'єкційного розчину препарату «Ангіолін» визначали в тканинах серця білих щурів протягом 3 год після одноразового в/м введення. На кожну точку визначення концентрації брали серця з 5 тварин.

Для визначення інших фармакокінетичних параметрів, які неможливо було дослідити в експериментах на тваринах в умовах *in vivo*, застосовували математичне моделювання віртуальних параметрів [12] на основі отриманих експериментальних даних із використанням комп'ютерної програми.

Цифрові результати експериментів піддавали статистичній обробці з використанням стандартних комп'ютерних програм Microsoft Excel та Statistika 6,0 з орієнтуванням на t-критерії Стьюдента [10, 11].

Результати та їх обговорення. Типові хроматограми, які було отримано в різні проміжки часу після ін'єкції, наведено на рисунках 1–7. Динаміку кількісного вмісту АФІ «Ангіолін» після перерахунку за площами відповідних хроматограм на їхню концентрацію в нг/г та мкг/г тканини серця після в/м введення 2,5 % розчину для ін'єкцій у дозі 50 мг/кг надано в таблиці 1, а графічне відображення – на рисунку 2.

Із результатів вмісту АФІ у тканинах серця, наданих у таблиці 1, видно, що

концентрація сполуки досить швидко зростала в тканині серця й уже на 5 хв після введення досягала порівняно високої концентрації $2147,0 \pm 571,3$ нг/г або $2,15$ мкг/г $\pm 0,57$ мкг/г тканини. Але вже на 10 хв після введення концентрація сполуки досягла максимального рівня й була $2688,6 \pm 280,8$ нг/г.

Після цього зростання насичення тканин серця препаратом припинилося, починався період виведення активної субстанції з міокардіоцитів. У цей період уміст АФІ у серці починав зменшуватися, і на 20 хв він становив $2296,6 \pm 247,9$ нг/г, що на 14,9 % менше порівняно з попереднім періодом.

У наступній точці, через 40 хв, концентрація швидко (більше ніж удвічі) зменшувалася й уміст активної субстанції «Ангіолін» був у цей період $955,0 \pm 126,3$ нг/г тканини серця. Через 60 хв рівень АФІ препарату знизився до концентрації $250,0 \pm 65,6$ нг/г, тобто вона була майже в 4 рази меншою порівняно з попереднім терміном.

Така висока швидкість зникнення АФІ «Ангіолін» з міокарда призвела до зменшення концентрації на 2 год до величини меншої, ніж нижня межа кількісного визначення (НМКВ) (табл. 1, рис. 2).

Аналізуючи отримані дані щодо кінетики активної складової препарату «Ангіолін», можна вважати, що її розподіл і накопичення в міокардіоцитах (альфа-фаза тканинної кінетики) як клітинах-мішенях досить високі, і вже через 13 ± 3 хв реєстрували її максимальний рівень у тканинах серця тварин. Однак високий рівень АФІ утримувався тільки до 20 хв, а після цього починалося зменшення концентрації препарату. Спочатку – повільне в період з 10 по 20 хв, а після цього відбувалося досить швидке зниження вмісту сполуки в серці, і через 2 год її концентрація була меншою, ніж НМКВ (рис. 2).

Результати визначення інших фармакокінетичних параметрів АФІ «Ангіолін» у тканинах серця після його в/м введення, обрахованих шляхом використання математичного моделювання віртуальних параметрів, наведено в таблиці 2.

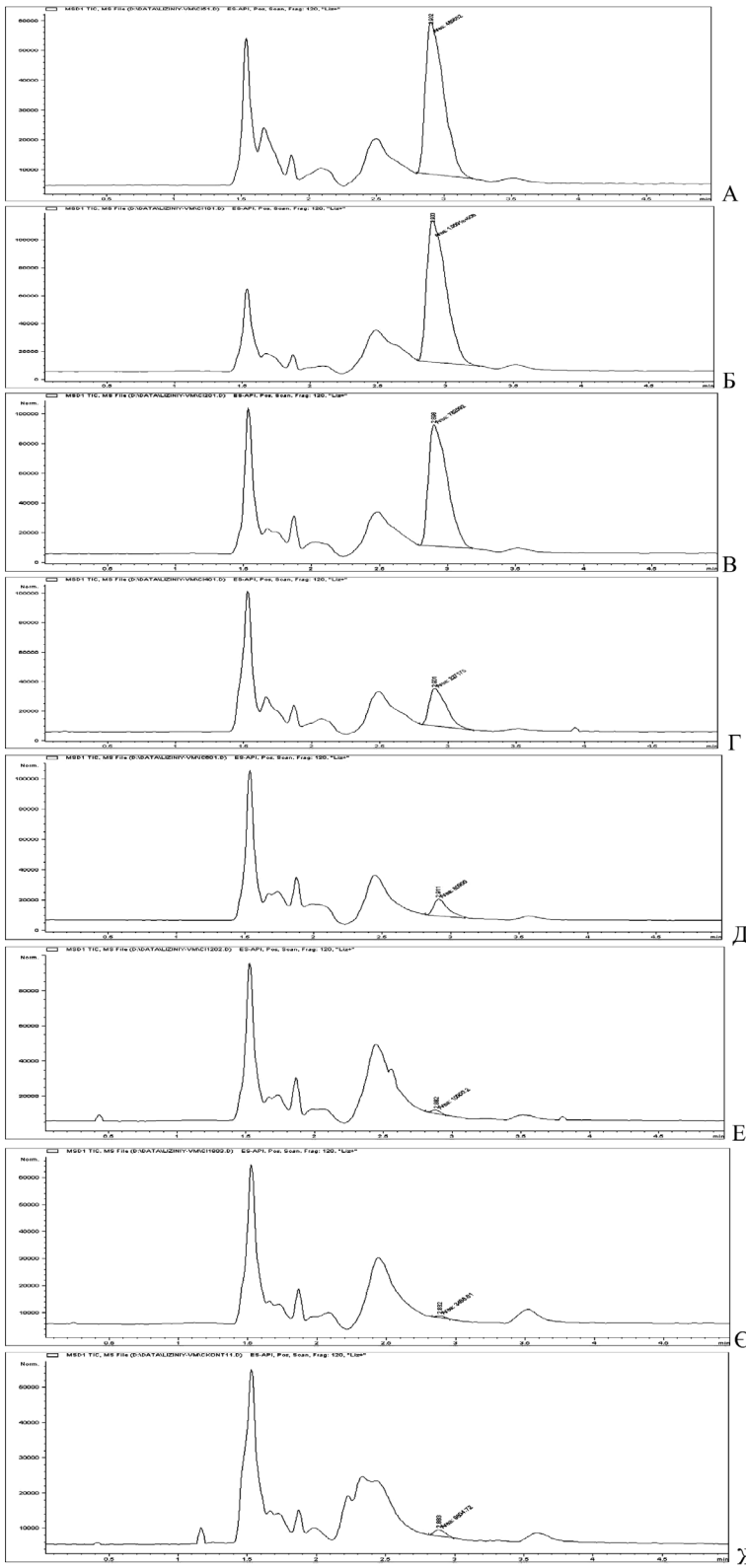


Рис. 1 Хроматограми сполуки «Ангіолін» у різні періоди після внутрішньом'язового введення щурам: А – 5 хв, Б – 10 хв, В – 20 хв, Г – 40 хв, Д – 60 хв, Е – 120 хв, Є – 180 хв, Ж – контроль

Уміст активного фармацевтичного інгредієнта препарату «Ангіолін» у тканині серця щурів після одноразового внутрішньом'язового введення в дозі 50 мг/кг (n = 5 у кожній точці виміру)

Уміст активного фармацевтичного інгредієнта, нг/г	Час після введення, хв						
	5	10	20	40	60	120	180
M	2147,0	2688,6	2296,6	955,0	250,0	< НМКВ	< НМКВ
± m	571,3	280,8	247,9	126,3	65,6	< НМКВ	< НМКВ

Примітка. M – середнє значення, ± m – стандартна похибка, НМКВ – нижня межа кількісного визначення.

Без сумніву, світова тенденція до заміни тварин з проведенням експериментальних визначень, комп'ютерним моделюванням і розрахунками параметрів фармакокінетики, особливо її сегмента визначення рівня досліджуваної сполуки в недоступних тканинах за клінічних умов, поступово витісняє досліди на тваринах і в майбутньому збереже життя мільйонів живих істот. Однак відразу перейти до віртуальної фармакокінетики неможливо без накопичення фактичного матеріалу, тому кожний такий досвід дає можливість порівнювати обидва способи одержання інформації й оцінити його адекватність і достовірність показників, отриманих обома шляхами. Нині існують сотні комп'ютерних програм, за якими можна обраховувати параметри фармакокінетики, і цей процес набирає все більшу швидкість.

Тому в цьому дослідженні були використані одночасно два підходи – експериментальний і віртуальний, і нам здавалося природним порівняти їхні параметри. Виявилось, що порівняльний аналіз даних експериментальної ФК АФІ сполуки «Ангіолін» у тканинах серця на тваринах і отриманих при обрахуванні за комп'ютерною програ-

мою віртуальних параметрів показав як збіжність, так і розходження даних. Такими параметрами, що практично співпадають, можна вважати час досягнення максимального рівня АФІ у тканині серця (відповідно $T_{C_{max}} = 13,00 \pm 3,00$ хв та $8,67 \pm 0,93$ хв) та максимальна досягнута концентрація (відповідно $C_{max} = 2688,6 \pm 280,8$ нг/г і $2028,0 \pm 110,4$ нг/г).

Натомість, показник середнього часу перебування сполуки в серці за експериментальними та розрахунковими даними відрізняється значно більше. За дослідними даними цей показник становив у середньому $135,1 \pm 35,5$ хв, а за математичним моделюванням – лише $39,4 \pm 20,9$ хв, тобто дійсний термін виявився майже в 2 рази довшим, ніж розрахунковий.

Таким чином активна складова препарату «Ангіолін» у серці знаходилася у високій концентрації майже цілу годину, і тільки після цього рівень АФІ препарату починав знижуватися і досягав величин, менших за НМКВ. Саме цей експериментальний показник є основою розрахунків режиму дозування при проведенні I фази клінічних випробувань нового лікарського засобу.

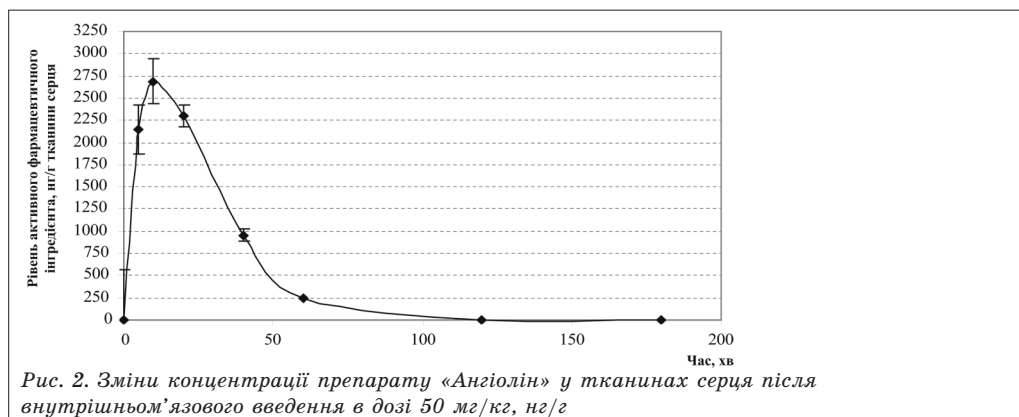


Рис. 2. Зміни концентрації препарату «Ангіолін» у тканинах серця після внутрішньом'язового введення в дозі 50 мг/кг, нг/г

Фармакокінетичні параметри активного фармацевтичного інгредієнта препарату «Ангіолін» у тканинах серця щурів після одноразового внутрішньом'язового введення, обраховані шляхом математичного комп'ютерного моделювання

№	Параметр	Показник і розмірність	Серце
1	Час досягнення максимальної концентрації	t , хв	$8,67 \pm 0,93$
2	Максимальна концентрація препарату	C_{\max} , нг/г	$2028,0 \pm 110,4$
3	Стаціонарний об'єм розподілу	V , мл	$16\ 823,5 \pm 8357,8$
4	Площа під фармакокінетичною кривою	AUC нг·хв/г	$88\ 260,0 \pm 13\ 748,8$
5	Константа елімінації	K_{el} (хв ⁻¹)	$0,050 \pm 0,006$
6	Загальний кліренс	Cl_t нг/хв	$639\ 393,8 \pm 121\ 126,0$
7	Середній час перебування в тканинах серця	MRT, хв	$39,42 \pm 20,91$

Висновки

1. Активний фармацевтичний інгредієнт нової ін'єкційної форми препарату «Ангіолін» після одноразового внутрішньом'язового введення досягав максимальної концентрації (C_{\max}) $2688,6 \pm 280,8$ нг/г у серці щурів через $13,0 \pm 3,0$ хв ($T_{C_{\max}}$).

2. Термін перебування незміненої фракції АФІ препарату «Ангіолін» у тканинах серця щурів складав $135,1 \pm 35,5$ хв, після чого її концентрація стала меншою за НМКВ.

3. Показник кліренсу (Cl_t) активного фармацевтичного інгредієнта препарату «Ангіолін» з тканин серця становив $639\ 393,8 \pm 121\ 126,0$ нг/хв.

1. Счетная палата Украины: Проблема с сердечно-сосудистыми заболеваниями вышла за рамки медицины // Электронный ресурс. – Режим доступа: Фармацевтический дайджест No.33 (317) (18.08.14–24.08.14). Pharma.net.ua.
2. Катцунг Б. Г. Базисная и клиническая фармакология / Бертрам Г. Катцунг; Пер. с англ. – М. – Спб. : Бином-Невский діалект, 1998. – 1876 с.
3. Фармакокінетика / Н. Н. Каркищенко, В. В. Хоронько, С. А. Сергеева, В. Н. Каркищенко. – Ростов-на-Дону : «Феникс», 2001. – 384 с.
4. Головенко М. Я. Фізико-хімічна фармакологія: Монографія / М. Я. Головенко. – Одеса : Астропринт, 2004. – 720 с.
5. Мазур І. А. Патент України № 86668 № C07 D, A61K 31/41 «Ангіолін 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтової кислоти, володіючий нейропротективною, ноотропною, кардіопротективною, ендотеліотропною, протиішемічною, антиоксидантною, протизапальною, протигіпоксичною дією 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.
6. Фармакологическая коррекция нарушений в сопряженных системах NO-свободные тиолы при экспериментальном инфаркте миокарда с помощью метаболитотропного кардиопротектора «Лизиний» / И. Ф. Беленічев, Л. И. Кучеренко, Н. В. Бухтиарова [та ін.] // Электронный ресурс. – Режим доступа: Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry № 2(58)/2012.
7. Серцева тканинна біодоступність та показники розрахункової фармакокінетики нової кардіотропної сполуки «Ангіолін» / Л. І. Кучеренко, В. М. Бобков, О. І. Барчина [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 5 (30). – С. 37–43.
8. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України. ДП «Наук.-експертн. фармакоп. центр». 1-е вид. – Харків : РІРЕГ, 2001. – Доп. 1. – 2004. – С. 58-67.
9. Либина В. В. Национальные и международные правила проведения биоаналитических исследований по оценке биоэквивалентности генерических препаратов / Либина В. В. // Вісник фармакології та фармацевції. – 2006. – № 8. – С. 30–37.
10. Гельман В. Я. Медицинская информатика: практикум / Гельман В. Я. – СПб. : Питер, 2001. – 480 с.
11. Лапач С. Н. Статистика в науке и бизнесе / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2002. – 640 с.
12. Мирошниченко И. И. Основы фармакокинетики. – М. : «ГЭОТАР-МЕД», 2002. – 192 с.

О. К. Ярош, О. О. Нагорна, Л. І. Кучеренко, А. В. Волуй, О. В. Кузнецова
Кардіотропність нової ін'єкційної форми препарату «Ангіолін»
після внутрішньом'язового введення

За розробленою і валідованою, згідно із національними вимогами ДФУ і ДЕЦ МОЗ України та міжнародними рекомендаціями EMEA і FDA, методикою кількісного визначення активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ) вивчено кардіотропність препарату «Ангіолін» (НВО «Фарматрон») після одно-разового внутрішньом'язового введення з використанням мас-спектрометричної ВЕРХ. АФІ препарату швидко, протягом $13,0 \pm 3,0$ хв, досягав максимальної концентрації в тканинах серця на рівні $2688,6 \pm 280,8$ нг/г. Рівень сполуки в тканинах серця знижувався через 20 хв після в/м введення і досягав концентрації меншої, ніж межа кількісного визначення в середньому через $135,1 \pm 35,5$ хв.

За результатами математичного моделювання час досягнення максимальної концентрації ($T_{C_{max}}$) у міокардіоцитах становить у середньому $8,67 \pm 0,93$ хв, максимальна концентрація препарату (C_{max}) у тканинах серця – $2028,0 \pm 110,4$ нг/г, площа під фармакокінетичною кривою (AUC) – $88\ 260,0 \pm 13\ 748,8$ нг/хв-г.

За експериментальними даними середній час перебування препарату в міокарді складав $135,1 \pm 35,5$ хв, після чого концентрація ставала меншою ніж нижня межа кількісного визначення, у той час як за результатами комп'ютерного моделювання він був лише $39,4 \pm 20,9$ хв.

Ключові слова: кардіотропність, препарат «Ангіолін», міокард, внутрішньом'язове введення, ВЕРХ

А. К. Ярош, Е. А. Нагорная, Л. И. Кучеренко, А. В. Волуй, Е. В. Кузнецова
Кардиотропность новой инъекционной формы препарата «Ангиолин» после
внутримышечного введения

По разработанной и валидированной в полном соответствии с национальными требованиями ГФУ и ГЭЦ МЗ Украины и международными рекомендациями EMEA и FDA методике количественного определения активного фармацевтического ингредиента (АФИ) изучена кардиотропность препарата «Ангиолин» (НПО «Фарматрон») после однократного внутримышечного введения с использованием масс-спектрометрической ВЭЖХ. Параметры фармакокинетики определяли у крыс после однократного внутримышечного введения раствора Ангиолина в дозе 50 мг/кг. Активный фармацевтический ингредиент препарата быстро, в течение в среднем $13,0 \pm 3,0$ мин, достигал максимальной концентрации в тканях сердца – $2688,6 \pm 280,8$ нг/г. Уровень соединения в тканях сердца снижался через 20 мин после в/м введения и достигал концентрации меньшей, чем нижний предел количественного определения в среднем через $135,1 \pm 35,5$ мин.

По результатам математического моделирования время достижения максимальной концентрации ($T_{C_{max}}$) в миокарде составляет в среднем $8,67 \pm 0,93$ мин, максимальная концентрация препарата (C_{max}) в тканях сердца – $2028,0 \pm 110,4$ нг/г, площадь под фармакокінетической кривой (AUC) – $88\ 260,0 \pm 13\ 748,8$ нг-мин/г.

По экспериментальным данным среднее время пребывания препарата в миокарде составляло $135,1 \pm 35,5$ мин, затем концентрация становилась меньше нижнего предела количественного определения, в то время как по результатам компьютерного моделирования оно составляло только $39,4 \pm 20,9$ мин.

Ключевые слова: кардиотропность, препарат «Ангиолин», миокард, внутримышечное введение, ВЭЖХ

А. К. Yarosh, H. A. Nagornaya, L. I. Kutsherenko, A. V. Volui, H. V. Kuznietsova
Cardiotropism of a new injectable form of the drug «Angiolin» after intramuscular
administration

The aim of this study was to estimate the myocardium pharmacokinetics of the drug «Angiolin» in new injectable form. Mass-spectrometry HPLC quantitative determination of the active pharmaceutical compound (APC) of «Angiolin» in the heart tissues was performed after a single intramuscular injection 50 mg/kg to rats. The active pharmaceutical compound of the drug quickly reached a maximum concentration in the heart tissues at the level of $2688,6 \pm 280,8$ ng-min/g within an average of $13,0$ min \pm $3,0$ min. Highest levels of compound was reduced 20 min after i/m administration and reached a concentration below the lower limit of quantification of an average of $135,1 \pm 35,5$ min.

Based on the results of mathematical modeling the time to reach maximum concentration ($T_{C_{max}}$) in myocardium averaged $8,67 \pm 0,93$ min, maximum drug concentration (C_{max}) in the heart tissues – $2028,0 \pm 110,4$ ng/g, the area under the concentration-time curve (AUC) – $88\ 260,0 \pm 13\ 748,8$ ng/min-g. According to experimental data the average residence time of the drug in the myocardium was $135,1 \pm 35,5$ min, then the concentration becomes smaller than the lower limit of quantification, while as to the results of computer modeling it was only $39,4 \pm 20,9$ min.

Key words: cardiotropism, «Angiolin», myocardium, intramuscular administration, HPLC.

Надійшла: 21.10.2014 р.

Контактна особа: Ярош Олександр Кузьмич, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Е. Потье, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 98 65. Електронна пошта: yarosh44@mail.ru