

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2015

А. А. Старостенко, А. В. Троицкий, В. С. Медведев, Е. П. Гуляева,  
Т. Н. Быстрова, В. А. Шкурупий

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ОКИСЛЕННЫХ ДЕКСТРАНОВ

Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины СО РАМН,  
Россия, Новосибирск

Изложены методы получения биотинилированного окисленного декстрана (БТОД) и процедуры проведения фармакокинетики БТОД и биотинилированного декстрана (БТД). Полученные фармакокинетические данные показали, что принципиальных отличий между окисленными и неокисленными декстранами нет, для всех исследованных видов декстранов при интраперитонеальном и подкожном путях введения характерен двухфазный фармакокинетический профиль.

**Ключевые слова:** окисленный декстран; фармакокинетика; биотин; иммуноферментный анализ.

Некоторые водорастворимые полимеры после соответствующей активации могут быть использованы в качестве перспективных носителей для иммобилизации лекарственных препаратов. Ранее сотрудниками нашей лаборатории показано [1–3], что декстран, окисленный в водных растворах с использованием в качестве окислителя перманганатом калия ( $\text{KMnO}_4$ ), может быть рассмотрен как перспективный носитель для иммобилизации противотуберкулезных препаратов, в частности гидразида изоникотиновой кислоты. Схожий результат был получен в исследованиях конъюгата окисленного декстрана с амфотерицином В [3, 4]. Несмотря на перспективность создания новых лекарственных композиций на базе конъюгатов окисленного декстрана до настоящего времени их фармакокинетические характеристики мало изучены. Необходимость исследования фармакокинетических характеристик окисленных декстранов обусловлена не только определением механизмов лечебного действия окисленных декстранов и их конъюгатов с лекарственными субстанциями, но и для разработки оптимальных схем лечения, чтобы избежать токсического кумулятивного действия и эффектов избыточного внутриклеточного накопления.

Целью настоящей работы является сравнительное исследование фармакокинетических профилей окисленных декстранов после однократного внутрибрюшинного или подкожного введения их водных растворов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали модифицированные полисахариды — биотинилированный декстран (БТД) с средней молекулярной массой 70 кДа (Fluka, 14402-25 MG). Окисленные декстраны со средней молекуляр-

ной массой 70 кДа получали из соответствующих декстранов (Sigma CAS: 9004-54-0) путем окисления их  $\text{KMnO}_4$  в кислой среде по ранее разработанному методу [5].

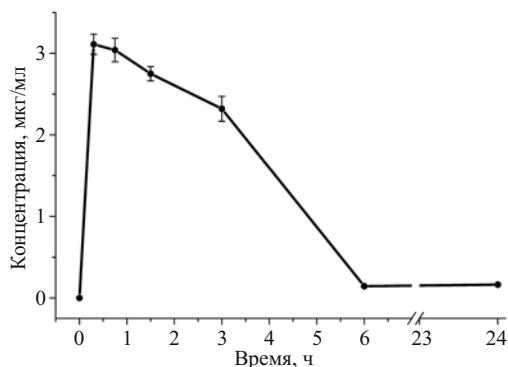
**Биотинилирование окисленного декстрана.** Окисленные декстраны массой по 250 мг помещали в мерные пробирки на 5 мл, добавляли по 5 мл трис-ацетатного буфера с  $\text{pH} = 5,5$  (Sigma CAS: 77-86-1), перемешивая полученные растворы, добавляли гидразид биотина (Sigma CAS: 109276-34-8), в молярном соотношении окисленный декстран — биотин = 1:10. Перемешивали и оставляли при температуре 18–20 °С на 24 ч для завершения реакции. В результате получатся растворы БТОД с концентрациями  $5 \cdot 10^{-2}$  г/см<sup>3</sup>.

**Для иммуноферментного анализа использовали следующие реактивы:**

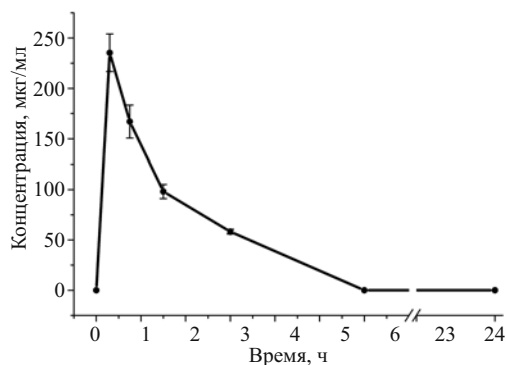
– Промывочный буфер (ФСБ-Т) — раствор, содержащий в 1 л воды 358 г гидрофосфата натрия (Sigma CAS: 10039-32-4), 225 г хлорида натрия (Sigma CAS: 7647-14-5), 2,5 г мертиолята (Sigma CAS: 54-64-8), 12,5 мл твина 20 (Sigma CAS: 9005-64-5). Раствор ФСБ-Т перед использованием разбавляли дистиллированной водой в 25 раз.

– Буфер для разведения образцов и конъюгата (БРОК) — раствор, содержащий в 1 л воды 20 мл 5 % раствора казеина (Sigma, USA), 40 мл ФСБ-Т, 1 мл проклин 300 (ProClin® 300, Supelco).  $\text{pH}$  раствора 7,0–7,6.

– Буфер для разведения субстрата (БРС) — раствор, содержащий в 1 л воды 27,8 г гидрофосфата натрия (Sigma-Aldrich CAS: 10039-32-4), 5,1 г лимонной кислоты (Sigma-Aldrich CAS: 77-92-9), 0,5 г бензоата натрия (Sigma CAS: 532-32-1), 0,3 г гидроперита (Aldrich CAS: 124-43-6), 2,5 мл проклин 300 (ProClin® 300, Supelco).  $\text{pH}$  5,0.



**Рис. 1.** Концентрация БТД в крови мышей от времени после интраперитонеального введения.



**Рис. 2.** Концентрация БТОД в крови мышей от времени после интраперитонеального введения.

– Хромофорный агент тетраметилбензидин (ТМБ) — раствор, содержащий в 1 л диметилсульфоксида (Sigma CAS: 67-68-5) 5 г ТМБ (Aldrich CAS: 54827-17-7), 10 мл 0,1 % раствор гидрохинона (Sigma CAS: 123-31-9). Перед использованием разводили БРС 1:34 по объему.

– Стоп реагент — водный 1 М раствор серной кислоты (Aldrich CAS: 7664-93-9).

– Активатор хромофорной группы стрептавидин-пероксидаза хрена (Кг) — раствор, содержащий конъюгат SA-HRP (SP80C, Stereospecific Detection Technologies) 2 мл, стабилизатор SA1 (Stereospecific Detection Technologies) до 100 мл. Перед использованием разводили буфером БРОК 1:41.

**Подготовка проб для иммуноферментного анализа (ИФА).** У мышей получали по 0,02 мл крови из хвостовой вены через 0,3; 0,75; 1,5; 3; 6 и 24 ч после интраперитонеального или подкожного введения образцов БТД и БТОД. К полученной крови добавляли 0,18 мл гепаринизированной сыворотки крупного рогатого скота (400 МЕ/мл) (БиолоТ, Санкт-Петербург), перемешивали и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Для проведения ИФА анализа использовали 0,14 мл супернатанта.

**Проведение иммуноферментного анализа.** Подготовленные образцы крови разбавляли БРОК, 1:1, перемешивали и добавляли в лунки планшета по 100 мкл, инкубировали в течение 30 мин. Промывали лунки раствором ФСБ-Т. В лунки добавляли по 100 мкл раствора конъюгата, инкубировали в течение 20 мин. Промывали лунки раствором ФСБ-Т и добавляли по 100 мкл раствора ТМБ, инкубировали в течение 15 мин. Реакцию останавливали внесением 50 мкл стоп-реагента и через 10 мин измеряли оптическую плотность растворов на приборе Bio-Tek Instruments EL808 MicroplateReader при длинах волн  $\lambda = 450/630$  нм. Абсолютные значения концентраций исследуемых веществ в крови находили по соответствующим калибровочным графикам. Процессы инкубирования проводили при температуре 37 °С и скорости перемешивания 500 об/мин в шейкер-термостате

### Результаты и их обсуждение

Количественное определение неокисленных и окисленных биотинилированных декстранов в крови экспериментальных животных производили методом гетерогенного твердофазного ИФА на 96-луночных планшетах, покрытых стрептавидином (MBU Technologies, Russia).

Эксперименты выполнены на 40 мышах-самцах гибридной линии СВА/С57 Black/ F1 массой 23 – 31 г в 4 группах по 10 в каждой. Группа 1 – 100 мкл БТД (0,2 мг/мл интраперитонеально), группа 2 – 100 мкл БТД (0,2 мг/мл подкожно), группа 3 – 100 мкл БТОД (10 мг/мл интраперитонеально), группа 4 – 100 мкл БТОД (10 мг/мл подкожно).

Для анализа фармакокинетических параметров использовали программу PK Solutions, USA. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ Statistica 8.0 и OriginPro 7.5.

### Фармакокинетика БТД и БТОД при интраперитонеальном введении

На рис. 1 представлена зависимость изменения концентрации БТД в крови от времени после однократного интраперитонеального введения в дозе 20 мкг на мышь. Как видно из представленных результатов, максимальное значение концентрации исследуемого вещества в сыворотке крови ( $C_{max}$ ) достигалась за 0,3 ч после введения и составляла 3111 нг/мл ( $p < 0,05$ ) крови. Затем в течение последующих 6 ч концентрация декстрана в крови падала и к концу 6 ч составляла не более 144 нг/мл (менее 5 % от  $C_{max}$ ,  $p < 0,05$ ). На уровне фоновых значений декстран в крови наблюдали до 24 ч после введения, и его концентрация не превышала 100 нг/мл ( $p < 0,05$ ). Период полувыведения БТД ( $t_{1/2}$ ) составляет 4 ч.

На рис. 2 представлена зависимость изменения концентрации БТОД в крови от времени после однократного интраперитонеального введения в дозе 1 мг на мышь. Как видно из представленных результатов,  $C_{max}$  достигалась за 0,3 ч и составляла 235 мкг/мл ( $p < 0,05$ ) в крови, в течение последующих 6 ч концентрация декстрана в крови падала к концу 6 ч до

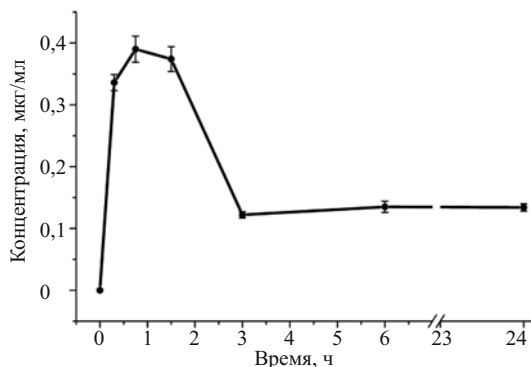


Рис. 3. Концентрация БТД в крови мышей от времени после подкожного введения.

10 нг/мл ( $p < 0,05$ ).  $AUC_6 = 559$  мкг · ч/мл. Через 24 ч после введения БТД и БТОД в крови не обнаруживали.

Фармакокинетические профили БТД и БТОД при интраперитонеальном введении схожи и могут быть условно разделены на 2 фазы. Первая фаза профилей (1 – 6 ч после введения) — быстрое выведение из крови большей части введенной дозы, и вторая фаза профилей (6 – 24 ч после введения) — медленное выведение оставшейся части БТД и БТОД. Известно, что декстраны в водном растворе способны проникать в клетки ретикуло-эндотелиальной системы и системы мононуклеарных фагоцитов посредством рецептор-опосредованного пиноцитоза. Значительную часть введенных модифицированных декстранов захватывают мононуклеарные фагоциты. Поэтому вероятно, что первая фаза фармакокинетики при интраперитонеальном введении связана с быстрым транспортом БТД и БТОД в системный кровоток, так как данный путь введения препаратов эквивалентен в экспериментах *in vivo* внутривенному введению [6]. В этой фазе также происходит быстрая элиминация исследуемых веществ из системного кровотока, которая, наиболее вероятно, в большей степени связана с почечной экскрецией и захватом его фагоцитирующими клетками, клетками эндотелия синусоидов печени и, отчасти, гепатоцитами. Вторая фаза фармакокинетики — это, наиболее вероятно, фаза внутриклеточного захвата и перераспределения БТД и БТОД в клетках ретикуло-эндотелиальной системы (макрофаги, эндотелиоциты, гепатоциты, клетки Купфера). Через 48 ч в крови мышей БТД и БТОД не детектируются, что свидетельствует о их полном выведении.

#### Фармакокинетика БТД и БТОД при подкожном введении

После подкожного введения БТД (рис. 3) в дозе, эквивалентной для интраперитонеального способа введения, наблюдали несколько иную фармакокинетику. Двухфазный характер фармакокинетического профиля оставался прежним, но при этом время достижения максимальной концентрации действующего вещества в сыворотке крови ( $T_{max}$ ) составило 0,75 ч. Падение концентрации БТД в крови произошло за более короткий период — в течение 3 ч. Во второй фазе фармако-

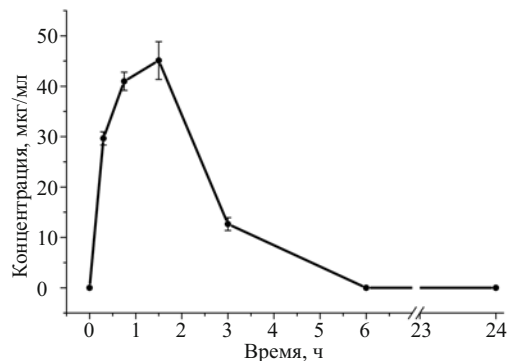


Рис. 4. Концентрация БТОД в крови мышей от времени после подкожного введения.  $AUC_{24} = 128$  мкг · ч/мл.

кинетики БТД после подкожного введения его концентрация в крови также составляла не более 100 нг/мл ( $p < 0,05$ ). Такую концентрацию БТД регистрировали до 24 ч, а через 48 ч БТД в крови не определялся.

На рис. 4 представлена зависимость изменения концентрации БТОД в крови от времени после однократного подкожного введения в дозе 1 мг на мышшь. Как видно из представленных результатов  $C_{max}$  достигался за 1,5 ч и составлял 45 мкг/мл ( $p < 0,05$ ) в крови, затем в течение последующих часов концентрация декстрана в крови к концу 6 ч не превышала 10 нг/мл ( $p < 0,05$ ).  $AUC_6 = 128$  мкг · ч/мл. Через 24 ч в крови БТОД не обнаруживали.

Учитывая, что при подкожном и интраперитонеальном введении дозы БТД и БТОД были эквивалентны, следует обратить внимание на более низкие  $C_{max}$  при подкожном введении, что может свидетельствовать о снижении биодоступности препаратов при подкожном пути введения по сравнению с интраперитонеальным. Сравнение “площадей” под фармакокинетической кривой позволяет оценить относительную биодоступность БТД и БТОД при подкожном введении, которая составляет не более 10 % от биодоступности при интраперитонеальном введении.

Таким образом, проведенные фармакокинетические исследования водных растворов конъюгатов окисленных и неокисленных декстранов с биотином позволяют сделать вывод о том, что окисление декстранов принципиально не изменяет их фармакокинетических характеристик при подкожном и интраперитонеальном путях введения мышам. Для всех исследованных декстранов характерен сходный двухфазный фармакокинетический профиль: первая фаза — активная абсорбция и активная элиминация из системного кровотока (более 90 % от введенной дозы декстрана); и вторая фаза — медленное выведение из системного кровотока остаточных количеств декстрана (менее 10 % от введенной дозы). В то же время замена интраперитонеального способа введения препарата на подкожный снижает его биодоступность примерно на 90 %.

## ЛИТЕРАТУРА

1. V. A. Shkurupy, S. A. Archipov, V. O. Tkachev, et al., *Experim. Biol. Med.*, **146**, 627 – 629 (2008).
2. V. A. Shkurupy, A. V. Troitsky, O. V. Potapova, N. G. Luzgina, Patent EA200801377A1 (2009).
3. V. A. Shkurupy, A. V. Troitsky, O. V. Potapova, N. G. Luzgina, Patent EA200801376A1 (2009).
4. V. A. Shkurupy, A. V. Troitsky, N. G. Luzgina, Patent RU 2430730 (2011).
5. В. А. Шкарупий, С. А. Архипов, А. В. Троицкий и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, № 11, 563 – 567 (2008).
6. E. I. Vereschagin, Do-Hung Han, A. W. Troitsky, et al., *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 229 – 233 (2001).

Поступила 26.01.15

## STUDYING PHARMACOKINETICS OF OXIDIZED DEXTRANS

A. A. Starostenko, A. V. Troitskii, V. S. Medvedev, E. P. Gulyaeva, T. N. Bystrova, and V. A. Shkurupii

Institute of Experimental and Clinical Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, 630117 Russia

Methods of obtaining biotinylated oxidized dextran (BTOD) and procedures used for studying BTOD and biotinylated dextran (BTD) pharmacokinetics are described. The obtained pharmacokinetic data showed that there are no principal differences between oxidized and unoxidized dextrans in this respect. All dextrans studied upon intraperitoneal and subcutaneous administration were characterized by two-phase pharmacokinetic profiles.

**Keywords:** oxidized dextrans; pharmacokinetics; biotin; immunoenzyme analysis.