

А. А. Старостенко, В. С. Медведев, А. В. Троицкий, Т. Н. Быстрова,
С. А. Архипов, В. А. Шкурупий

ФАРМАКОКИНЕТИКА КОНЬЮГАТА ПОЛИАЛЬДЕГИДДЕКСТРАНА С ГИДРАЗИДОМ ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

ФГБНУ “Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины”, Россия, Новосибирск.

Изучена фармакокинетика перспективной противотуберкулезной субстанции “декстразид”, представляющей собой конъюгат гидразида изоникотиновой кислоты и полиальдегиддекстрана. Описаны методы исследования фармакокинетики декстразида на мышцах аутбредной линии ICR. Приведены результаты исследования, указывающие на двухфазный характер фармакокинетики декстразида.

Ключевые слова: декстразид; фармакокинетика; полиальдегиддекстран.

Исследование фармакокинетики препарата является одним из наиболее важных этапов в процессе создания и вывода лекарственного вещества на фармацевтический рынок. Декстразид — перспективная противотуберкулезная лекарственная субстанция на основе полиальдегиддекстрана (I) и гидразида изоникотиновой кислоты (II). На сегодняшний день хорошо изучена фармакокинетика препаратов “полиглюкин”, “рео-полиглюкин” [1] и гидразида изоникотиновой кислоты [2], являющихся предшественниками и структурными аналогами инновационной субстанции “декстразид”. Основной задачей при создании нового противотуберкулезного лекарственного средства было получение фармацевтической субстанции комплексного действия с низкой токсичностью.

Исследование фармакокинетики позволяет надеяться, что декстразид получит применение в практике лечения сложных хронических форм туберкулеза за счет составления более эффективных, по сравнению с традиционными, схем лечения. Все этапы данного исследования проведены по нормам GLP для доклинических исследований. Фармакокинетику лекарственной субстанции декстразид определяли с целью нахождения количественной характеристики процесса элиминации действующего вещества из системного кровотока и тканей органов (печень, почки, селезенка) при однократном внутривенном введении у мышей аутбредной линии ICR.

Экспериментальная химическая часть

Декстразид (ДЗ). ДЗ получают путем частичной конъюгации II и I [3] со средней молекулярной массой

40 кДа. К 200 мл водного 10 % раствора I при перемешивании и нагревании до 85 °С прибавляют мелкоизмельченный II в количестве 1,1 г. Реакционную массу выдерживают в течение 2,5 ч, охлаждают и пропускают через мембранный фильтр Eppendorf с диаметром пор 0,9 мкм для удаления возможных твердых примесей.

Меченный флуоресцеином ДЗ (III). Для приготовления раствора III с концентрацией 10 мг/мл в микропробирке типа Eppendorf объемом 2 мл смешивают 300 мкл водного раствора ДЗ с концентрацией 55 мг/мл (по II), 1200 мкл дистиллированной воды, 75 мг гидрокарбоната натрия и 15 мг флуоресцеинизотиоцианата. Реакционную массу перемешивают до полного растворения всех компонентов и оставляют полученный раствор на 4 сут для завершения реакции. Для отчистки от возможных твердых примесей перед использованием раствор 30 мин центрифугируют на ультрацентрифуге при 10000 об/мин.

Экспериментальная биологическая часть

Фармакокинетика ДЗ в сыворотке крови. В качестве тест-системы использовали 78 самцов мышей 2-месячного возраста со средней массой 30 г. В течение 14 дней до эксперимента животных содержали на карантине. Перед непосредственным введением вещества каждую особь взвешивали для расчета дозы, которую вводили однократно внутривенно. После введения исследуемого препарата проводили забор крови из яремной вены, предварительно подвергнув животное легкому эфирному наркозу, в следующие временные точки: через 5; 15; 30; 45; 60; 120; 180; 240 и 300 мин.

Элиминация биотинилированного ДЗ (IV) в органах (пкс.кв. – единица измерения суммарной площади окраски)

Орган	Контроль	Содержание IV, пкс. кв.				
		1 ч	5 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Селезенка	6261 ± 1216	16226 ± 1806	62997 ± 4459	43313 ± 5130	26001 ± 2065	13149 ± 2126
Почки	5351 ± 943	88109 ± 6919	83524 ± 6277	72356 ± 5971	17176 ± 2397	12780 ± 4729
Печень	11792 ± 3855	25798 ± 3975	46425 ± 7760	68970 ± 6645	22999 ± 4126	20561 ± 3965

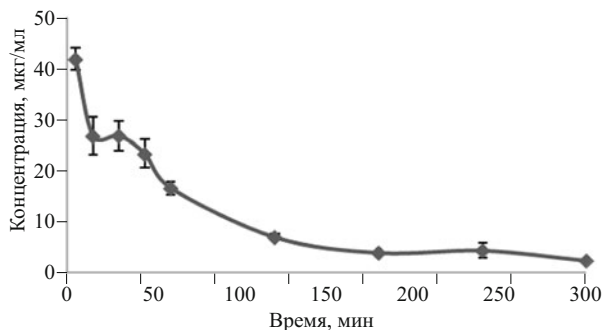


Рис. 1. Концентрация ДЗ в крови по ГИНК.

Из полученных образцов крови готовили сыворотку на анализ.

Фармакокинетику ДЗ в крови исследовали методом проникающей ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией по II на хроматографическом комплексе Shimadzu LC-20AD, хроматографическая колонка Phenomenex BioSep-SEC-S 3000, длина волны детектирования $\lambda = 264$ нм. Для валидации результатов фармакокинетики ДЗ проводили фармакокинетику меченого III в крови методом проникающей ВЭЖХ с флуориметрической детекцией, длина волны возбуждения $\lambda = 480$ нм, длина волны поглощений $\lambda = 520$ нм. Объем проб исследуемых образцов сыворотки крови 30 мкл, скорость элюирования 1,5 мл/мин, время элюирования 28 мин, элюент — 3 % трис-фосфатный буфер с pH = 7,1.

Фармакокинетику ДЗ в тканях органов исследовали, используя модельное вещество биотинилированный декстразид (IV). Процесс биотинилирования ДЗ проводили в соответствии со стандартной методикой [4]. Доза вводимого раствора по IV 125 мг/кг. В качестве контроля использовали животных, которым вводили 10 % водный раствор реополиглобулина. Животных взвешивали непосредственно перед введением вещества для расчета дозы на животное. Исследуемые растворы вводили внутривенно в хвостовую вену. Забор органов проводили во временные точки 1, 5, 24, 48 и 72 ч после введения препарата. Извлеченные органы замораживали при температуре -20 °C, через 48 ч получали криостатические срезы толщиной 30 мкм, используя криотом CryoStar NX70 (Microm, Германия, “ThermoScientific”). Проводили стандартную цитохимическую окраску, включающую последовательную инкубацию образцов с конъюгатом стрептавидин-пероксидазой (30 мин) и инкубацию в субстрате с хромогеном диаминобензидином (2 мин). Морфометрический анализ гистологических препаратов проводили на микроскопе AxioVision Z1, для калибровки изображений использовали морфометрический модуль программы “AxioVision v.8”. Для анализа фармакокинетических параметров ДЗ в сыворотке крови использовали программу PK Solutions (USA). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ Statistica 8.0, OriginPro 7.5 и MicrosoftExcel 2010.

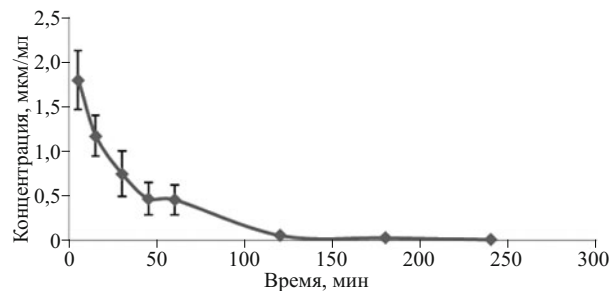


Рис. 2. Концентрация ДЗ в крови по III.

Результаты и их обсуждение

В результате анализа зависимости концентрации ДЗ в сыворотке крови исследуемых мышей (рис. 1) определены средние значения фармакокинетических параметров при однократном внутривенном введении препарата (доза 30 мг/кг, средняя масса по группе 0,03 кг). Время полувыведения $T_{1/2} = 194$ мин, $AUC_{0-t} = 2,8$ мг/мл · мин, $AUC_{\infty} = 3,4$ мг/мл · мин, $AUMC_{\infty} = 540,4$ мг/мл · мин², $MRT = 161$ мин, $V_{SS} = 42$ мл, $Cl = 0,312$ мл/мин.

Фармакокинетические параметры при однократном внутривенном введении III в крови у мышей (доза 30 мг/кг, средняя масса по группе 0,03 кг) приведены на рис. 2. Время полувыведения $T_{1/2} = 49$ мин, $AUC_{0-t} = 0,07$ мг/мл · мин, $AUC_{\infty} = 0,07$ мг/мл · мин, $AUMC_{\infty} = 3,2$ мг/мл · мин², $MRT = 45$ мин, $V_{SS} = 523$ мл, $Cl = 11,8$ мл/мин.

Как видно из полученных результатов (рис. 1 и 2), параметры элиминации ДЗ из крови (по II) в наибольшей степени соответствуют литературным данным фармакокинетики изониазида [5], в частности для ДЗ время полувыведения $T_{1/2} = 3,2$ ч, а в литературных данных для изониазида — 3,9 ч. Это связано с тем, что при анализе использовали прямое количественное определение II в сыворотке крови мышей методом ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией. В анализе фармакокинетики III по II параметр элиминации значительно ниже и составляет $T_{1/2} = 0,8$ ч. Подобный эффект может быть связан с тем, что флуоресцентное производное II представляет собой индивидуальное химическое соединение с индивидуальными фармакокинетическими характеристиками, которые могут не соответствовать фармакокинетическим характеристикам немодифицированного II. В связи с этим для наиболее точной оценки фармакокинетики ДЗ целесообразно использовать данные, полученные методом проникающей ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией по II. После однократного *in vivo* введения ДЗ мышам в дозе 30 мг/кг по II полное выведение из системного кровотока II происходит в течение 5 – 6 ч.

При однократном введении *in vivo* мышам IV (таблица) определяется в ткани почек в максимальной концентрации через 1 ч после введения, в ткани селезенки — через 5 ч, в ткани печени — через 24 ч. Через 72 ч концентрация IV в тканях почек, селезенки и печени

снижается, приближаясь к фоновым значениям. Характер элиминации IV обусловлен спецификой выведения высокомолекулярного (40 кДа) конъюгата полиальдегиддекстрана с II.

Таким образом, в результате проведенных исследований определены основные фармакокинетические параметры изучаемой субстанции препарата ДЗ. Установлено, что основные фармакокинетические показатели ДЗ схожи с аналогичными показателями для II. Фармакокинетика ДЗ при однократном *in vivo* введении мышам состоит из 2 фаз. В первой фазе (до 6 ч после введения) происходит элиминация свободного II и не захваченного клетками тканей ДЗ, во второй фазе

(до 2,5 сут) — элиминация конъюгата I с II из тканей внутренних органов (печень, селезенка, почки).

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Kroemer, A. Haass, K. Muller, et al., *Eur. J. Clin. Rhaps.*, **31**, 705 – 710 (1987).
2. W. W. Weber, D. W. Hein, *Clin. Pharmacokinet.*, **4**(6), 401 – 422 (1979)
3. В. С. Медведев, А. В. Троицкий, Е. П. Гуляева и др., *Вестн. нов. мед. тех.*, **1**(19), 104 – 106 (2012).
4. A. Reiner, C. L. Veenman, L. Medina, et al., *J. Neurosci. Method.*, **103**(1), 23 – 37 (2000).
5. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, A. Moffat, M. Osselton, B. Widdop (eds.), Pharmaceutical Press (2003).

Поступила 03.04.15

PHARMACOKINETICS OF POLYALDEHYDE DEXTRAN CONJUGATE WITH ISONICOTINIC ACID HYDRAZIDE

A. A. Starostenko, V. S. Medvedev, A. V. Troitskii, T. N. Bystrova, S. A. Arkhipov, and V. A. Shkurupii

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

The pharmacokinetics of dextrazide preparation, representing polyaldehyde dextran conjugate with isonicotinic acid hydrazide, has been studied on outbred mice of the ICR line. The obtained results are indicative of a two-phase character of the pharmacokinetics of dextrazide.

Keywords: dextrazide; pharmacokinetics; polyaldehyde dextran.