

УДК 615.015;615.033.1.543:615.2/3.615.349

*О.С. Лалыменко, М.Я. Кудря, Л.Е. Никишина,
И.В. Завгородний*, А.С. Шаламай***

*ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского
НАМН Украины», г. Харьков*

** Харьковский национальный медицинский университет*

*** ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ», г. Киев*

ОСОБЕННОСТИ ТОКСИКОКИНЕТИКИ АНТИДИАБЕТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА, ПРОИЗВОДНОГО ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ, ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ

Изучена токсикокинетика сукцинатсодержащего антидиабетического средства β -фенилэтиламида 2-оксисукцинаниловой кислоты (β -ФЭА-ОСАК) и его метаболитов 2-гидроксибензилсукцинамида (2-ГФСА) и β -фенилэтилсукцинамида (β -ФЭСА) в условиях однократного внутрижелудочного введения субстанции β -ФЭА-ОСАК в дозе 100 мг/кг массы тела крысам-самцам. Количественное определение исследуемых соединений в плазме крови животных проведено с использованием разработанного нами метода высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. Установлено, что соединения идентифицируются в плазме крови через 30 мин, средняя максимальная концентрация β -ФЭСА выше по сравнению с β -ФЭА-ОСАК и 2-ГФСА, соединения длительно циркулируют в системном кровотоке, наиболее длительный период полувыведения имеет β -ФЭСА, процессы биотрансформации β -ФЭА-ОСАК несколько преобладают над его экскрецией.

Ключевые слова: антидиабетическое средство, токсикокинетика, хроматографический анализ.

Как известно, хемобиокинетика (токсикокинетика) изучает взаимодействие между ксенобиотиками и биологической системой на уровне определенной концентрации чужеродного соединения во внутренней среде организма. Изучение особенностей токсикокинетики конкретного соединения способствует более тонкому и точному анализу закономерностей поступления, распределения, биотрансформации, элиминации экзогенного химического соединения и представляет несомненный интерес для профилактической токсикологии [1].

Исследование кинетических параметров ксенобиотика, в том числе и лекарственного средства в организме, является сложной задачей. В настоящее время в подобных

исследованиях ограничиваются определением общих механизмов кинетического процесса и основных токсикокинетических параметров.

Важным этапом изучения ксенобиотиков является определение количественных характеристик процессов абсорбции, распределения и элиминации. Процессы, происходящие в организме с ксенобиотиками, в том числе с лекарственными средствами, характеризуются рядом токсикокинетических параметров: C_{max} – максимальная концентрация соединения в биологическом субстрате; AUC_{0-t} – площадь под токсикокинетической кривой зависимости концентрации ксенобиотика от времени влияния с момента введения соединения в организм до последней точки

© О.С. Лалыменко, М.Я. Кудря, Л.Е. Никишина и др., 2016

отбора проб; Cl – общий клиренс – параметр, соответствующий определенному объему тест-ткани, который освобождается от ксенобиотика в единицу времени; $T_{1/2}$ – период полувыведения, то есть время элиминации из организма половины введенной дозы соединения, соответствует времени уменьшения в два раза концентрации ксенобиотика в плазме крови на участке моноэкспоненциального снижения плазменного уровня введенного вещества; K_{el} – константа скорости элиминации, характеризует скорость выведения препарата из организма путем экскреции и биотрансформации [2].

Для изучения токсикокинетики лекарственных средств необходимо наличие аналитических методик количественного определения их в биологических субстратах, которые базируются на современных инструментальных методах исследований и имеют высокую чувствительность и селективность [3].

Немаловажное значение в понимании характера кинетики распределения ксенобиотика имеет выбор кинетической модели, позволяющей получить более полную характеристику скорости парциальных процессов, данные о количественном содержании вещества или некоторых его метаболитов во времени, а также оценить вариабельность токсикокинетических профилей в зависимости от различных видов воздействия ксенобиотика на организм [4].

Выбранное для исследования антидиабетическое средство β -фенилэтиламин 2-оксисукцинаниловой кислоты (β -ФЭА-ОСАК) имеет широкий спектр фармакологического действия: антигипергликемическое, антиоксидантное, способность стимулировать регенерацию и секреторную функцию панкреатических β -клеток, защищать их от деструкции диабетогенными факторами, тормозить развитие диабетических микро- и макроангиопатий в условиях относительной или абсолютной инсулиновой недостаточности [5].

Следует учитывать, что попавшие в организм чужеродные соединения, к которым относятся и лекарственные средства, подвергаются метаболическому превращению с образованием реакционноспособных соединений, которые, как правило, быстро элиминируются из организма, однако могут вызывать разнонаправленные биологические эффекты в том числе и токсические [6].

Согласно теории метаболизма, в первую фазу метаболического превращения β -ФЭА-ОСАК могут образовываться такие активные метаболиты, как 2-гидроксифенилсукцин-амид (2-ГФСА) и β -фенилэтилсукцинамид (β -ФЭСА).

В настоящее время проводится активная работа по внедрению антидиабетического средства β -ФЭА-ОСАК в производство, в связи с чем целесообразным является углубленное изучение особенностей его токсикокинетики с последующей разработкой методов биологического мониторинга в условиях производственного выпуска этого средства.

Целью данного исследования было определение токсикокинетических параметров антидиабетического средства с помощью разработанного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях однократного внутрижелудочного поступления соединения в организм животных.

Материал и методы. Эксперименты проведены на нелинейных белых крысах-самцах массой тела 200–240 г, которых содержали в условиях вивария в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Украина, 2001) на обычном сбалансированном рационе и свободном доступе к воде [7]. Особенности токсикокинетики изучены в условиях однократного внутрижелудочного введения водной эмульсии субстанции β -ФЭА-ОСАК с твин-80 в дозе 100 мг/кг массы тела. Проведено количественное определение плазменных концентраций β -ФЭА-ОСАК и его метаболитов 2-ГФСА, β -ФЭСА в дискретные временные интервалы: через 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 24 и 48 часов после введения соединения. Концентрацию исходного соединения и его метаболитов в плазме крови крыс определяли с помощью разработанной нами биоаналитической методики ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1260 (США) со спектрофотометрическим детектором, колонкой стальной размером 250×4,0 мм, заполненной фазой Nucleosil 100-5 C18. Подвижная фаза состоит из буферного раствора ацетонитрила и метанола в соотношении 5:28:67 при $pH=2,3$. Измерения проводят при температуре колонки 40 °С, скорости подвижной фазы 1,0 мл/мин, детектирование – при длине волны 210 нм.

Подготовка проб плазмы крови животных включает этап термоденатурации аликвот

плазмы крови на водяной бане в течение 5 мин при +70 °С, ферментативную деконъюгацию метаболитов β-ФЭА-ОСАК в течение 1 ч при +37 °С и осаждение протеинов плазмы крови раствором ацетонитрила с последующим хроматографированием проб, идентификацией и количественным определением исследуемых соединений.

Для расчета концентраций β-ФЭА-ОСАК/метаболитов в пробах плазмы крови подопытных животных использовали метод внутреннего стандарта, в качестве которого выбран нипагин (метилвый эфир парагидроксibenзойной кислоты).

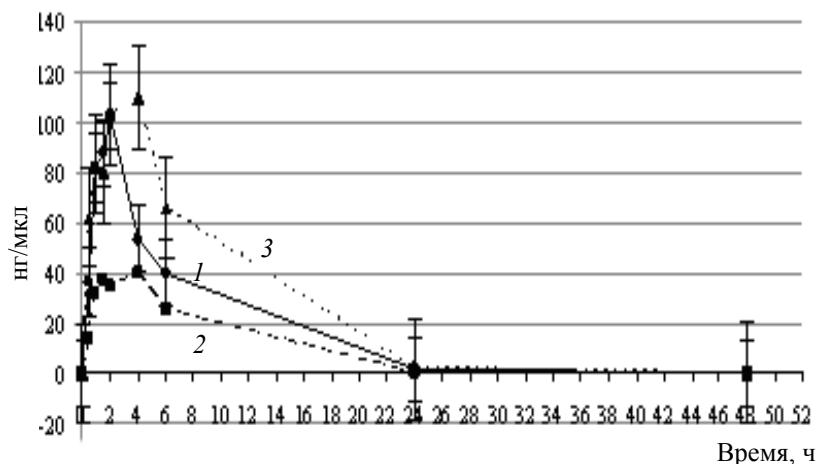
Кинетические параметры β-ФЭА-ОСАК определены на основании смешанного линейно-логарифмического метода статистических моментов. При этом рассчитывали длительность периода полувыведения соединений ($T_{1/2}$) как натуральный логарифм $\ln 2/k_{el}$; константу скорости элиминации (K_{el}), оцениваемую по угловому коэффициенту конечного моноэкспоненциального участка токсикокинетической кривой, описанного с помощью нелинейного регрессионного анализа; площадь под токсикокинетической кривой (AUC_{0-t}) начиная с нулевого значения времени до времени отбора последнего образца плазмы крови с помощью метода трапеций; общий клиренс (Cl_t), а также время достижения максимальной концентрации β-ФЭА-ОСАК/метаболитов (C_{max}) в плазме крови. После проведения логарифмического преобразования основных токсикокинетических параметров значения анализировали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) [8]. Для всех токсикокинетических

показателей рассчитывали следующие параметры дескриптивной статистики: среднее арифметическое значение (\bar{X}), стандартное отклонение среднего (SD), стандартную ошибку средней величины ($S_{\bar{X}}$), коэффициент вариации (CV). Фактический материал обрабатывали методами вариационной статистики с определением параметрических и непараметрических критериев.

Результаты и их обсуждение. Процессы, происходящие с поступившими в организм ксенобиотиками, в том числе и лекарственными средствами, характеризуются, как известно, рядом кинетических параметров, которые дают возможность определить зависимость экзогенного воздействия ксенобиотика от времени и пути поступления его в организм. Плазма крови при этом обеспечивает равномерное распределение соединения по тканям всего организма, в связи с чем именно этот биосубстрат считается наиболее адекватным при оценке кинетических характеристик [4].

В результате проведенных исследований выявлены усредненные токсикокинетические профили зависимости концентрации β-ФЭА-ОСАК, 2-ГФСА и β-ФЭСА в плазме крови подопытных животных от времени наблюдения. Соответствующие данные представлены на рисунке.

Анализ приведенных на рисунке основных токсикокинетических профилей показал, что β-ФЭА-ОСАК и два его метаболита идентифицируются в плазме крови крыс уже через 30 мин, их концентрации возрастают в первые 2 часа после внутрижелудочного введения. После этого концентрации исследуемых сое-



Усредненные токсикокинетические профили β-ФЭА-ОСАК (1), его метаболитов 2-ГФСА (2) и β-ФЭСА (3) в плазме крови крыс после однократного внутрижелудочного введения субстанции β-ФЭА-ОСАК в дозе 100 мг/кг массы тела ($n=5$; $\bar{X} \pm SD$)

динений снижаются, и через 48 часов исходное соединение и продукты его биотрансформации практически не определяются в плазме крови.

Далее определены основные параметры токсикокинетики субстанции β -ФЭА-ОСАК и его метаболитов, которые представлены в таблице.

Токсикокинетические параметры β -ФЭА-ОСАК и его метаболитов в плазме крови крыс, n=5

Показатель	C_{max} , нг/мкл	$T_{1/2}$, ч	K_{el} , ч ⁻¹	Cl, л·ч ⁻¹	AUC ₀₋₄₈ , нг/(мкл·ч)
β-ФЭА-ОСАК					
\bar{X}	102,8	5,1	0,1536	0,04	796,4
$S_{\bar{X}}$	8,6	0,91	0,024	0,008	208,4
CV, %	18,8	40,4	35,5	45,5	58,4
2-ГФСА					
\bar{X}	39,9	5,2	0,1422	0,094	317,9
$S_{\bar{X}}$	4,6	0,76	0,016	0,016	88,7
CV, %	25,7	32,6	25,2	39,3	62,3
β-ФЭСА					
\bar{X}	109,7	7,5	0,1086	0,03	1236,2
$S_{\bar{X}}$	11,5	1,2	0,03	0,008	278,5
CV, %	23,4	36,1	54,4	65,5	50,4

Как видно из таблицы, средняя максимальная концентрация β -ФЭА-ОСАК достигает пикового уровня через 2 часа после введения. Вместе с тем, метаболиты в плазме крови распределяются диспропорционально: количественные уровни метаболита β -ФЭСА в плазме крови значительно превышают концентрацию 2-ГФСА на протяжении всего срока наблюдения.

При оценке параметра, который характеризует длительность выведения из организма исследуемых соединений ($T_{1/2}$), следует отметить, что для β -ФЭА-ОСАК и одного из его метаболитов – 2-ГФСА значения $T_{1/2}$ находятся приблизительно на одном уровне, а для β -ФЭСА этот параметр на 47 % больше. Полученные значения $T_{1/2}$ для исследуемых веществ свидетельствуют об относительно медленном выведении их из организма. Поскольку почечной фильтрации подвергаются только не связанные с протеинами плазмы крови лекарственные средства [10], можно предположить, что изучаемым соединениям свойственна достаточно сильная связь с белками плазмы крови и их элиминация из плазмы в большей степени осуществляется благодаря экстраренальному клиренсу. Относительно высокое значение $T_{1/2}$ для β -ФЭСА по сравнению с β -ФЭА-ОСАК и другим метаболитом – 2-ГФСА свидетельствует о

продолговании времени циркуляции данного соединения в кровотоке и возможно более высоком сродстве к альбуминам плазмы крови.

При анализе средних значений площади под токсикокинетической кривой AUC₀₋₄₈ установлено, что наибольшее значение площади наблюдается у β -ФЭСА, что, очевидно,

связано с пролонгацией периода его выведения и более длительным пребыванием в системном кровотоке. Наименьшее значение данного показателя отмечено у другого метаболита – 2-ГФСА по сравнению с показателями β -ФЭА-ОСАК и β -ФЭСА, что, по-видимому, обусловлено низким значением площади под токсикокинетической кривой и соответственно более высоким уровнем системного клиренса (таблица).

Для описания динамики концентрации соединения в сыворотке/плазме крови используют математические модели фармако/токсикокинетики. При этом в качестве единиц системы-организма выделяют условные показатели – камеры (компарменты), являющиеся частью системы, в которой равномерно распределен ксенобиотик. После распределения в объеме камеры концентрация ксенобиотика постепенно снижается при участии двух процессов: биотрансформации и экскреции. Оба процесса объединены и описываются с помощью k_{el} – константы скорости элиминации, которая характеризует скорость выведения ксенобиотика из организма путем биотрансформации или экскреции [9]. Нам установлено, что наибольшее среднее значение константы скорости элиминации имеет место у исходного соединения в сравнении с аналогичным показателем для его мета-

болитов, наименьшее значение k_{el} отмечено у метаболита β -ФЭСА.

Необходимо учитывать, что любой ксенобиотик, попадая в организм, сначала поступает в кровь/плазму, а потом из нее переходит в другие органы и ткани, то есть в организме существуют два потока распределения [10]. Исходя из этого, следует отметить, что в данном случае первые два часа преобладает поступление β -ФЭА-ОСАК в плазму крови, спустя 2–3 часа происходит постепенное метаболическое преобразование, о чем свидетельствует возрастание количественных уровней его метаболитов в плазме крови с последующим выведением соединений из организма.

Таким образом, полученные результаты показали, что ведущую роль в элиминации β -ФЭА-ОСАК играют, по-видимому, процессы его биотрансформации, которые несколько преобладают над процессами экскреции неизмененного соединения в условиях однократного внутрижелудочного поступления в организм.

Выводы

1. Разработан селективный, чувствительный метод количественного и качественного

определения антидиабетического средства β -фенилэтиламида 2-оксисукцинаниловой кислоты /его метаболитов в плазме крови крыс на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2. Установлено, что в условиях однократного внутрижелудочного введения антидиабетического средства в организм крыс в дозе 100 мг/кг массы тела происходит быстрое поступление и относительно длительная циркуляция соединения и продуктов его биотрансформации в системном кровотоке, наиболее выраженная у одного из его метаболитов, о чем свидетельствуют относительно высокие значения $T_{1/2}$, площади под токсикокинетической кривой AUC_{0-48} на фоне замедленного клиренса исходного соединения.

3. Процессы биотрансформации изученного антидиабетического средства несколько превалируют над его экскрецией, на что указывает увеличение константы скорости элиминации (k_{el}) на фоне относительно низких значений системного клиренса, а также удлинение времени достижения средних максимальных концентраций метаболитов по сравнению с основным соединением.

Литература

1. Соловьев В.Н. Фармакокинетика / В.Н. Соловьев, А.А. Фирсов, В.А. Филлов. – Москва: Медицина, 1980. – 424 с.
2. Головенко Н.Я. Физико-химическая фармакология: монография / Н.Я. Головенко. – Одесса: Астропринт, 2004. – 720 с.
3. Стыскин Е.Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде. – Москва: Медицина, 1986. – 205 с.
4. Белоусов Ю.Б. Клиническая фармакокинетика. Практика дозирования лекарств: спец. выпуск серии Рациональная фармакотерапия / Ю.Б. Белоусов, К.Г. Гуревич. – Москва: Литтерра, 2005. – 288 с.
5. Горбенко Н.І. Патогенетичне обґрунтування ефективності похідного янтарної кислоти – фенсукцинала в терапії цукрового діабету та його судинних ускладнень (експериментальне дослідження): автореф. дис. ... докт. біол. наук : 14.01.14 / Горбенко Н.І.; Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України. – Харків, 2004. – 36 с.
6. Пиотровски Е. Использование кинетики метаболизма и выведения токсических веществ в решении проблем промышленной токсикологии / Е. Пиотровски. – Москва: Медицина, 1976. – 194 с.
7. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.
8. Воробьев Д.В. Математическое моделирование фармакокинетических процессов при применении микроэлементных препаратов при гипозементозах / Д. В. Воробьев // Биологические науки. – 2011. – № 11. – С. 402–406.
9. Мирошниченко И.И. Основы фармакокинетики / И.И. Мирошниченко. – Москва: ГЭОТАР Медицина, 2002. – 200 с.
10. Кукес В.Г. Клиническая фармакология и фармакотерапия / В.Г. Кукес, А.К. Стародубцев. – 2-е изд. – Москва: ГЭОТАР Медицина, 2006. – 944 с.

О.С. Лалименко, М.Я. Кудря, Л.Е. Нікішина, І.В. Завгородній, А.С. Шаламай
ОСОБЛИВОСТІ ТОКСИКОКІНЕТИКИ АНТИДІАБЕТИЧНОГО ЗАСОБУ ПОХІДНОГО
БУРШТИНОВОЇ КИСЛОТИ ПРИ ОДНОРАЗОВОМУ ВНУТРІШНЬОШЛУНКОВОМУ
ВВЕДЕННІ ЩУРАМ

Вивчено токсикокінетику сукцинатвмісного антидіабетичного засобу β-фенілетиламіду 2-оксисукцинанілової кислоти (β-ФЕА-ОСАК)/його метаболітів 2-гідроксифенілсукцинамиду (2-ГФСА) та β-фенілетилсукцинамиду (β-ФЕСА) в умовах одноразового внутрішньошлункового введення субстанції β-ФЕА-ОСАК в дозі 100 мг/кг маси тіла щурів-самців. Кількісне визначення досліджуваних сполук у плазмі крові щурів-самців проведено з використанням розробленого нами методу високоефективної рідинної хроматографії зі спектрофотометричним детектуванням. Встановлено, що сполуки ідентифікуються в плазмі крові вже через 30 хв, середня максимальна концентрація β-ФЕСА вище в порівнянні з β-ФЕА-ОСАК та 2-ГФСА, сполуки тривало циркулюють у системному кровотоці, найбільш тривалий період напіввиведення має β-ФЕСА, процеси біотрансформації β-ФЕА-ОСАК децю переважають над його екскрецією.

Ключові слова: антидіабетичний засіб, токсикокінетика, хроматографічний аналіз.

O.S. Lalimenko, M.Ya. Kudria, L.Ye. Nikishina, I.V. Zavgorodnii, A.S. Shalamay
PECULIARITIES OF TOXICOKINETICS ANTIDIABETIC DRUG OF SUCCINIC ACID DERIVATIVE
WITH A SINGLE INTRAGASTRIC ADMINISTRATION IN RATS

Has been studied a toxicokinetics antidiabetic drug of succinic acid derivative β-phenylethylamide-2-oxysuccinatic acid (β-PhEA-OSA)/ metabolites 2-hydroxyphenylsuccinamide (2-HPhSA) and β-phenylethylsuccinamide (β-PhESA) in a single intragastric administration of substance β-PhEA-OSA 100 mg / kg in male rats. Quantification of test compounds in blood plasma of male rats was conducted using our method of high performance liquid chromatography (HPLC) with spectrophotometric detection. It has been found that the compounds are identified in plasma after 30 minutes, an average maximum concentration of β-PhESA higher than the β-PhEA-OSA and 2-HPhCA compounds continuously circulate in the systemic blood circulation, the longest period of semiremoval has β-PhESA the processes biotransformation of β-PhEA-OSA prevail a little over its excretion.

Key words: antidiabetic drug, toxicokinetics, chromatographic analysis.

Поступила 17.02.16