

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ФАРМАКОКИНЕТИКИ НОВОГО АНАЛЬГЕТИКА ИЗ КЛАССА ГЕКСААЗАИЗОВЮРЦИТАНА У КРЫС

УДК 615.033

<https://doi.org/10.7816/RCF17451-56>

© К.А. Лопатина¹, О.С. Брюшнина¹, Р.В. Гурто¹, С.Г. Крылова¹, Ю.Г. Зюзькова¹, Д.А. Кулагина², Е.А. Сафонова¹, Е.П. Зуева¹, С.В. Сысолятин²

¹ ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН, НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск;

² ФГБНУ «Институт проблем химико-энергетических технологий» Сибирского отделения РАН, Бийск

Для цитирования: Лопатина К.А., Брюшнина О.С., Гурто Р.В., и др. Некоторые аспекты фармакокинетики нового анальгетика из класса гексаазаизовюрцитана у крыс // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т. 17. – № 4. – С. 51–56. <https://doi.org/10.7816/RCF17451-56>

Поступила: 07.10.2019

Одобрена: 12.11.2019

Принята: 18.12.2019

Важным этапом доклинического исследования нового лекарственного средства является изучение его фармакокинетики: всасывания, распределения, метаболизма и выведения лекарственного соединения. **Целью** настоящего исследования стало изучение фармакокинетики у здоровых животных нового анальгетика на основе гексаазаизовюрцитана (тиовюрцина). **Материалы и методы.** Разработана и валидирована методика определения концентрации тиовюрцина в плазме крови и экскретах крыс. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии была определена ди-

намика концентраций тиовюрцина в плазме крови и экскретах крыс после однократного внутрижелудочного введения в дозе 100 мг/кг. **Результаты.** Пик концентрации тиовюрцина в плазме крови крыс приходится на 2 ч, что согласуется с данными фармакодинамики нового анальгетика, среднее время удерживания вещества в организме достигало 17,15 ч после введения. Возможно наличие фармакологически активных метаболитов.

◆ **Ключевые слова:** фармакокинетика; масс-спектрометрия; тиовюрцин; доклинические исследования.

SOME PHARMACOKINETICS ASPECTS OF NEW ANALGETICS FROM HEXAAZAIOWURITSITANE CLASS IN RATS

© К.А. Lopatina¹, O.S. Bryushinina¹, R.V. Gurto¹, S.G. Krylova¹, Yu.G. Zuzkova¹, D.A. Kulagina², E.A. Safonova¹, E.P. Zueva¹, S.V. Sysolyatin²

¹ Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia;

² Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch of the RAS, Biysk, Russia

For citation: Lopatina KA, Bryushinina OS, Gurto RV, et al. Some pharmacokinetics aspects of new analgetics from hexaazaisiowuritsitane class in rats. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(4):51-56. <https://doi.org/10.7816/RCF17451-56>

Received: 07.10.2019

Revised: 12.11.2019

Accepted: 18.12.2019

An important stage in the preclinical study of a new drug is the study of its pharmacokinetics: absorption, distribution, metabolism, and excretion of the drug compound. **The purpose** of this study was to study the pharmacokinetics in healthy animals of a new analgesic based on hexaazaisiowuritsitane (thiowurtzine). **Materials and methods.** A technique for determining the concentration of thiowurtzine in the blood plasma and rat excreta has been developed and validated. Using high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry, concentrations of thiowurt-

zine in plasma and rat excreta were determined after a single intragastric dose of 100 mg/kg. **Results.** The peak concentration of thiowurtzine in the blood plasma of rats accounts for 2 hours, which is consistent with the pharmacodynamic data of the analgesic, the average retention time of the substance in the body reached 17.15 h after administration. Thiowurtzine is believed to be actively metabolized.

◆ **Keywords:** pharmacokinetics; mass spectrometry; thiowurtzine; preclinical studies.

ВВЕДЕНИЕ

Важным этапом доклинического исследования нового лекарственного средства является из-

учение его фармакокинетики [1, 2]. Всасывание, распределение, метаболизм и выведение лекарственного соединения — взаимосвязанные процессы. Все они подвержены влиянию множества

факторов: скорость всасывания зависит от физико-химических свойств, лекарственной формы препарата, концентрации действующего вещества, pH среды, в которой происходит растворение вещества, перистальтики кишечника и состояния площади поверхности всасывания [3]. На показатели распределения и биотрансформации лекарственного препарата влияют пол, возраст, соматическое состояние организма, а также состояние ферментативных систем организма, что часто обусловлено индивидуальными различиями. Высокоэффективная жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия являются приоритетными инструментами при постановке методик, позволяющих проводить количественную оценку целевых молекул в сложных биологических матрицах [4–6].

Целью настоящего исследования было изучение у крыс фармакокинетики нового анальгетика, синтезированного в Институте проблем химико-энергетических технологий СО РАН (г. Бийск) на основе гексаазаизовюрцитана. К настоящему времени закончен этап испытаний на животных. Новый препарат на основе гексаазаизовюрцитана будет рекомендован для лечения болевого синдрома различной этиологии, благодаря своему мощному анальгетическому потенциалу и низкому профилю токсичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сведения об исследуемом веществе. Инновационная молекула представляет собой полиазотистое полициклическое соединение каркасного строения — 4-[(3,4-дибромтиофен)-2-карбонил]-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5.5.0.0^{3,11}.0^{5,9}]додекан (далее — тиовюрцин, TVC) (рис. 1). Получено впервые ацилированием промышленно доступного 2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5.5.0.0^{3,11}.0^{5,9}]додекана хлорангидридом 3,4-дибромтиофенкарбоновой кислоты. Процесс проводили в среде ацетонитрила при температуре кипения реакционной массы.

Дизайн исследования. Эксперименты выполнены на половозрелых аутбредных крысах-самцах (возраст 3 мес., масса тела 270–330 г), стока SD разводки отдела экспериментальных биологиче-

ских моделей Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга (НИИФирМ) Томского НИМЦ РАН.

В рамках выполненного исследования были изучены процессы: всасывания — оценена динамика концентраций тиовюрцина в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения; экскреции — исследована динамика выведения тиовюрцина с мочой и калом у крыс.

Тиовюрцин вводили крысам однократно внутривенно в дозе 100 мг/кг на 1 % крахмальном геле. В качестве основного биоматериала была использована кровь. Для оценки экскреции препарата животным натошак, однократно внутривенно вводили тиовюрцин в дозе 100 мг/кг, после чего животных помещали в индивидуальные метаболические клетки с доступом к воде и пище, и в течение 1 сут. был проведен забор экскретов (фекалии и моча) для оценки динамики выведения тиовюрцина и определения приоритетного пути выведения препарата.

Пробы крови у крыс отбирали до введения лекарственного средства и через 20, 40 мин и 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 16 и 24 ч после введения.

Животных, находящихся под наркозом в камере с CO₂, декапитировали и проводили забор органов и крови. Образцы крови собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали при 1600 g в течение 10 мин. Отобранная плазма помещалась в пластиковые пробирки и хранилась при температуре –24 °C до проведения аналитического этапа работы.

Методика количественного определения тиовюрцина. Методика количественного определения тиовюрцина в плазме крови и экскретах была впервые разработана и валидирована перед исследованием в лаборатории молекулярной и клинической физиологии НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга (Томский НИМЦ). Количественное определение тиовюрцина в биологических образцах животных проводили чувствительным, избирательным и точным хромато-масс-спектрометрическим методом. Исследование было проведено с использованием жидкостного хроматографа Prominence (Shimadzu) и гибридного масс-спектрометрического детектора AB Sciex 3200 Qtrap (AB Sciex, США), оснащенного линейной ловушкой. Источник ионизации — электроспрей Turbo V (ESI). Обработку хроматографических данных проводили с помощью программного обеспечения Analyst.

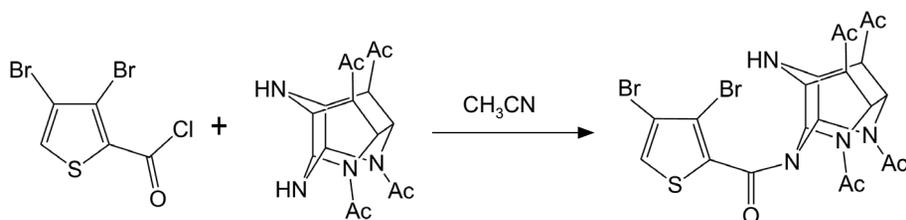


Рис. 1. Синтез 4-[(3,4-дибромтиофен)-2-карбонил]-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12-гексаазатетрацикло[5.5.0.0^{3,11}.0^{5,9}]додекана (тиовюрцина)

Условия хроматографического анализа и масс-спектрометрического детектирования были оптимизированы для обеспечения максимальной чувствительности детектора в режиме мониторинга множественных реакций (Multiple Reaction Monitoring, MRM) с использованием источника ионизации распылением в электрическом поле (ESI⁺). Давление газа-распылителя азота составило (GS1) — 35 psi, турбогаза для пробовода TurbolonSpray (GS2) — 45 psi; температура турбогаза — 525 °C; напряжение на иглораспылителе — 4,75 кВ; газовая завеса — 10 psi. Для детектирования использовали MRM-переходы: TVC — 604,8/268,8 (DP = 60, EP = 5,80, CE = 60, CEP = 27,57, CXP = 2,30, CAD = high).

Масс-спектр анализатора тиовюрцина представлен на рис. 2.

Хроматографическое разделение анализатора проводили на колонке ProntoSIL 120-3-C18 (ЗАО «Эко-Нова», Россия) 85 % элюентом В. Скорость потока была установлена 0,25 мл/мин, температура колонки 40 °C, в качестве элюента А использовали 5 мМ формиат аммония (pH = 2,8), элюента В — ацетонитрил. Перед хроматографическим анализом подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане и фильтровали. Хроматографический анализ проводили в градиентном режиме, объем инъекции анализатора — 5 мкл. Среднее время удерживания тиовюрцина составляло $1,60 \pm 0,02$ мин. Экспериментальные значения концентрации лекарственного средства в плазме крови рассчитывали после однократного введения тиовюрцина в динамике.

дается 2 фазы снижения концентрации вещества. В первой фазе (α -фазе) происходит резкое снижение, по-видимому, за счет быстрого распределения его в ткани органов (фаза распределения), полупериод распределения составляет 51 мин. Вторая фаза характеризуется более медленным снижением концентрации тиовюрцина и описывает кинетику выведения вещества из организма (фаза элиминации), полупериод элиминации — 16,3 ч. Значение среднего времени удерживания (17,15 ч) свидетельствует о медленном выведении тиовюрцина из организма.

Усредненный фармакокинетический профиль лекарственного средства в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 100 мг/кг представлен на рис. 3.

Оценка концентрации тиовюрцина в моче и кале крыс. Для оценки процесса элиминации лекарственного соединения из организма крыс использовали методику изучения кинетики выведения с мочой и калом. Концентрации тиовюрцина в моче и кале крыс на протяжении 1 сут после однократного введения препарата в дозе 100 мг/кг, суточный объем полученного экскрета на протяжении изучаемого периода и процент дозы представлены в табл. 1 и 2.

Результаты исследования экскреции тиовюрцина у крыс после внутривенного введения в дозе 100 мг/кг показали, что основная часть вещества выводится в течение первых суток: с калом — в среднем 3,37 % от введенной дозы, а с мочой — в среднем 0,01 % от введенной дозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика концентраций тиовюрцина в плазме крови крыс. Результаты исследования показали, что вещество достигает максимальной концентрации в течение 1,8 ч после введения. Затем наблю-

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные фармакокинетические исследования показали, что максимальные значения концентрации тиовюрцина в плазме крови крыс достигаются через 2 ч после введения

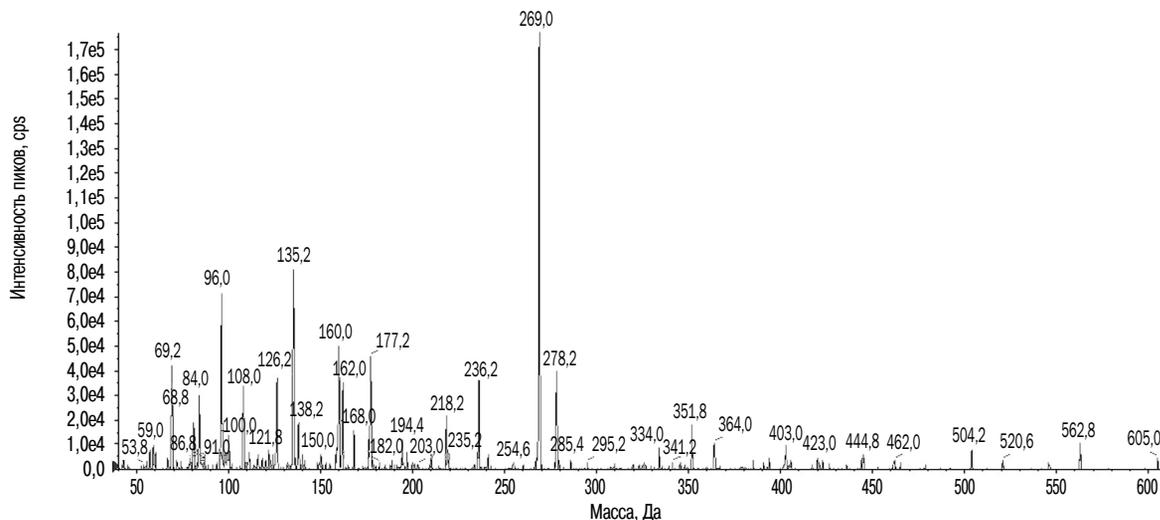


Рис. 2. Масс-спектр тиовюрцина

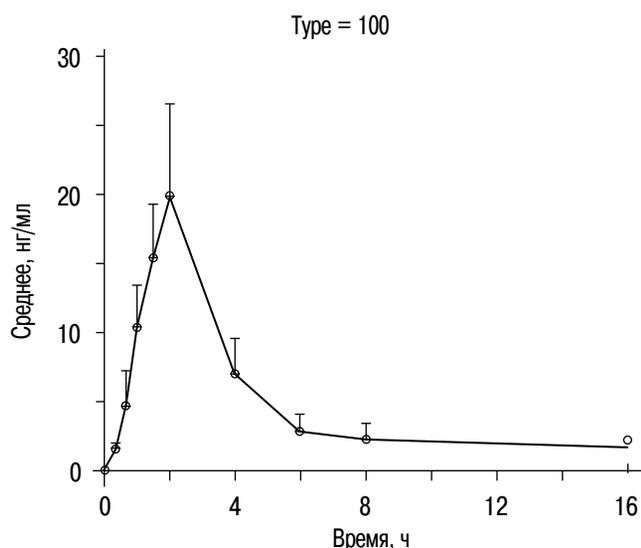


Рис. 3. Усредненный фармакокинетический профиль тиапрофена в плазме крови крыс после однократного внутрижелудочного введения в дозе 100 мг/кг

препарата в терапевтической дозе 100 мг/кг, что согласуется с данными фармакодинамики нового анальгетика: максимум анальгетической активности наблюдался в экспериментах «Горячая пластина», начиная с 1 ч после применения тиапрофена, и длился до 4 ч наблюдения. В тесте механической соматической боли при раздражении основания хвоста крыс по Гаффнеру анальгетический эффект длился до 16–17 ч, что соответствует фармакокинетическим данным, полученным в настоящем исследовании: среднее время удерживания вещества в организме достигало 17,15 ч после введения.

Низкое количество тиапрофена, выделенного в неизменном виде, свидетельствует об активном процессе биотрансформации, возможно наличие фармакологически активных метаболитов.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации

■ **Таблица 1.** Результаты оценки количества тиапрофена в моче крыс после однократного внутрижелудочного введения в дозе 100 мг/кг

№ пробы	Концентрация, нг/мл	Суточный объем мочи крыс, мл	Количество, мг	Процент дозы
1	390,7	8,5	0,0033	0,011
2	452,9	3,6	0,0016	0,005
3	195,6	11,2	0,0022	0,007
4	429,1	6,4	0,0027	0,009
5	224,2	6,0	0,0013	0,004
6	677,5	8,7	0,0059	0,020
<i>M</i>	395,0	7,4	0,0029	0,010
$\pm m$	195,7	2,9	0,0018	0,006
CV, %	49,6	39,0	63,8911	63,891

■ **Таблица 2.** Результаты оценки количества тиапрофена в кале крыс после однократного внутрижелудочного введения в дозе 100 мг/кг

№ пробы	Концентрация, нг/г	Суточный объем кала крыс, г	Количество, мг	Процент дозы
1	151257,0	4,0	0,61	2,02
2	202125,9	3,6	0,74	2,45
3	164212,9	3,0	0,49	1,64
4	379210,8	5,7	2,17	7,22
5	286761,6	5,4	1,54	5,13
6	215931,5	2,4	0,53	1,75
<i>M</i>	233250,0	4,0	1,01	3,37
$\pm m$	84938,6	1,4	0,73	2,45
CV, %	36,4	35,9	72,67	72,67

на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», госконтракт от 15 августа 2017 г. № 14.N08.11.0179 «Доклинические исследования лекарственного средства на основе производных гексаазаизоворцитана для терапии болевого синдрома различной этиологии».

ЛИТЕРАТУРА

1. Мирошниченко И.И. Основы фармакокинетики. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 192 с. [Miroshnichenko I.I. Osnovy farmakokinetiki. Moscow: GEOTAR-MED; 2002. 192 p. (In Russ.)]
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. Ч. 1. – М.: Гриф и К, 2013. – 944 с. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Ed. by A.N. Mironov. Part 1. Moscow: Grief and K; 2013. 944 p. (In Russ.)]
3. Сергиенко В.И., Желлифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. – М.: Издательство РАМН, 2003. – 208 с. [Sergienko V.I., Jellyff R., Bondareva I.B. Prikladnaya farmakokinetika: osnovnye polozheniya i klinicheskoe primeneniye. Moscow: Izdatel'stvo RAMN; 2003. 208 p. (In Russ.)]
4. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2001. – 384 с. [Karkishchenko N.N., Khoron'ko V.V., Sergeeva S.A., Karkishchenko V.N. Farmakokinetika. Rostov-na-Donu: Phoenix; 2001. 384 p. (In Russ.)]
5. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 493 с. [Lebedev A.T. Mass-spektrometriya v organicheskoy khimii. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2003. 493 p. (In Russ.)]
6. Niessen W.M.A. MS–MS and MSn. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. 3rd ed. Ed. by J.C. Lindon, G.E. Tranter, D. Koppenaal. Academic Press; 2016. P. 936-941.

♦ Информация об авторах

Ксения Александровна Лопатина — канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории онкофармакологии. ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН, НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск. E-mail: k.lopatina@pharmso.ru.

Ольга Сергеевна Брюшинина — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной и клинической физиологии. ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН, НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск. E-mail: k.lopatina@pharmso.ru.

Роман Владимирович Гурто — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной и клинической физиологии. ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН, НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск. E-mail: roman.gurto@pharmso.ru.

Светлана Геннадьевна Крылова — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории онкофармакологии. ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН, НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск. E-mail: krylova5935@gmail.com.

Юлия Геннадьевна Зюзькова — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клинической физиологии. ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН, НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск. E-mail: roman.gurto@pharmso.ru.

Дарья Александровна Кулагина — кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории медицинской химии. ФГБНУ «Институт проблем химико-энергетических технологий» Сибирского отделения РАН, Бийск. E-mail: imbir@rambler.ru.

Елена Андреевна Сафонова — канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории онкофармакологии. ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН, НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск. E-mail: safonova_7@mail.ru.

♦ Information about the authors

Ksenya A. Lopatina — PhD, Senior Researcher of Oncopharmacology Laboratory. Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia. E-mail: k.lopatina@pharmso.ru.

Olga S. Bryushinina — PhD, Researcher of Molecular and Clinical Physiology Laboratory. Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia. E-mail: k.lopatina@pharmso.ru.

Roman V. Gurto — PhD, Leading Researcher of Molecular and Clinical Physiology Laboratory. Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia. E-mail: roman.gurto@pharmso.ru.

Svetlana G. Krylova — PhD, MD, Leading Researcher of Oncopharmacology Laboratory. Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia. E-mail: krylova5935@gmail.com.

Yulia G. Zuzkova — Junior Researcher of Molecular and Clinical Physiology Laboratory. Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia. E-mail: roman.gurto@pharmso.ru.

Darya A. Kulagina — PhD, Researcher of Medical Chemistry Laboratory. Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch of the RAS, Biysk, Russia. E-mail: imbir@rambler.ru.

Elena A. Safonova — PhD, Researcher of Oncopharmacology Laboratory. Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia. E-mail: safonova_7@mail.ru.

♦ Информация об авторах

Елена Петровна Зуева — д-р биол. наук, заведующая лабораторией онкофармакологии. ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН, НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск. E-mail: zep0929@mail.ru.

Сергей Викторович Сысолятин — д-р хим. наук, директор. ФГБУН «Институт проблем химико-энергетических технологий» Сибирского отделения РАН, Бийск. E-mail: imbir@rambler.ru.

♦ Information about the authors

Elena P. Zueva — PhD, MD, Head of Oncopharmacology Laboratory. Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk, Russia. E-mail: zep0929@mail.ru.

Sergey V. Sysolyatin — PhD, MD, Head. Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch of the RAS, Biysk, Russia. E-mail: imbir@rambler.ru.