

Абсолютная биодоступность соединения, обладающего кардиопротективной активностью (АЛМ-802), у крыс

Колыванов Г. Б., Бочков П. О., Литвин А. А., Шевченко Р. В., Подолько А. Л., Жердев В. П.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аннотация. На крысах изучена фармакокинетика нового потенциального кардиопротективного средства АЛМ-802 после однократного внутривенного и внутрижелудочного введения в дозах 10 и 100 мг/кг, соответственно. Абсолютная биодоступность составила 4,45 %, что говорит о потенциальной возможности разработки лекарственной формы для приёма внутрь.

Ключевые слова: кардиопротектор; АЛМ-802; доклиническая фармакокинетика; ВЭЖХ-масс-спектрометрия; абсолютная биодоступность

Для цитирования:

Колыванов Г. Б., Бочков П. О., Литвин А. А., Шевченко Р. В., Подолько А. Л., Жердев В. П. Абсолютная биодоступность соединения, обладающего кардиопротективной активностью (АЛМ-802), у крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(2):31–35. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-31-35>

Поступила: 18 июля 2021 г. **Принята:** 13 августа 2021 г. **Опубликована:** 10 ноября 2021 г.

Absolute bioavailability of a substance with cardioprotective activity (ALM-802) in rats

Kolyvanov GB, Bochkov PO, Litvin AA, Shevchenko RV, Podolko AL, Zherdev VP

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The pharmacokinetics of a new potential cardioprotective agent ALM-802 was studied in rats after single intravenous and intragastric administration at doses of 10 and 100 mg/kg, respectively. The absolute bioavailability was 4.45 %, which indicates the potential for the development of a dosage form for oral administration.

Keywords: cardioprotector; ALM-802; preclinical pharmacokinetics; HPLC-mass spectrometry; absolute bioavailability

For citations:

Kolyvanov GB, Bochkov PO, Litvin AA, Shevchenko RV, Podolko AL, Zherdev VP. Absolute bioavailability of a substance with cardioprotective activity (ALM-802) in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(2):31–35. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-2-31-35>

Received: July 18, 2021. **Accepted:** August 13, 2021. **Published:** November 10, 2021

Введение / Introduction

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», в результате исследований в ряду α, ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил) аминов было выявлено соединение N_1 -(2,3,4-триметоксибензил)- N_2 -{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина (в виде тригидрохлорида) с рабочим шифром АЛМ-802, которое по своей кардиопротективной активности, изученной на животных с интактным сосудистым руслом, как минимум, не уступает эталонному препарату триметазидину [1].

Цель данного исследования — методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) изучить фармакокинетика АЛМ-802 в плазме крови крыс после однократного внутривенного (в/в) и внутрижелудочного (в/ж) введения и определить его абсолютную биодоступность.

Методика исследования / Method of research

Исследование проведено на половозрелых беспородных крысах-самцах с массой тела 180–220 г. Животные содержались в лабораторном виварии при 20–22 °С, относительной влажности воздуха 45–65 %, имели свободный доступ к корму и воде. Эксперименты проводили в соответствии с решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября

2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Изучение фармакокинетика соединения АЛМ-802 в плазме крови крыс проводили после в/в введения раствора (в воде дистиллированной с добавлением 1 капли полисорбата (твина 80) фармацевтической субстанции в дозе 10 мг/кг. Также исследуемое вещество вводили в/ж с помощью зонда в виде суспензии в 1 % крахмальном клейстере в дозе 100 мг/кг. Для определения абсолютной биодоступности АЛМ-802 пробы крови отбирали до введения вещества (контроль) и через 0,08; 0,17; 0,34; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12 ч после в/в введения и при в/ж введении — контроль и через 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12 ч. Анализу подвергали надосадочную жидкость, полученную после добавления к аликвоте плазмы крови 3-кратного объёма ацетонитрила и последующего центрифугирования. Количественное определение соединения АЛМ-802 проводили с использованием метода тандемной ВЭЖХ с масс-спектрометрией. В работе использовали жидкостной хроматограф «Thermo Ultimate 3000» («Thermo Scientific», США). Детектор — масс-спектрометр «Thermo TSQ Altis» («Thermo Scientific», США) (тип «тройной квадруполь») с ионизацией электрораспылением. Регистрацию масс-спектров проводили в режиме множественных молекулярных

реакций по дочернему иону с отношением массы к заряду $m/z = 181$, полученному изолированием и фрагментацией нативного молекулярного иона с $m/z = 464$ (соответствует протонированному молекулярному иону соединения АЛМ-802), напряжение на электродах в коллизионной ячейке составляло 25 В. Напряжение на распылителе – 3500 В, температура интерфейса – 350 °С; температура ионного капилляра – 325 °С, параметры вспомогательных газов-распылителей задавались управляющей программой по умолчанию для потока 0,3 мл/мин.

Подвижная фаза состояла из компонента А (0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде ультрачистой) и Б (к 50 мл воды ультрачистой прибавляли 1 мл муравьиной кислоты, полученный раствор доводили ацетонитрилом в мерном цилиндре до объёма 1,0 л). Растворы А и Б смешивали в соотношении 25:75. Полученную фазу перед использованием дегазировали на ультразвуковой бане.

Анализ выполняли на колонке «Agilent SB-phenyl» («Agilent», США) 2,1×100 мм с размером частиц 1,8 мкм. Температура термостата – 40 °С. Объём вводимой пробы 1 мкл. В этих условиях время удерживания соединения АЛМ-802 составило 1,7 мин. Нижний предел количественного определения – 1 нг/мл.

Исследование биотрансформации АЛМ-802 проводили в плазме крови, полученной через 1 и 2 ч после в/ж введения исследуемого вещества в дозе 100 мг/кг, и суточной моче крыс в сравнении с образцами интактной плазмы крови и мочи крыс. В одну пробу добавляли β-глюкуронидазу (Sigma-Aldrich, США), в другую – фермент не добавляли. На 0,1 мл плазмы крови добавляли 0,01 мл фермента, на 0,1 мл мочи – равный объём β-глюкуронидазы. Пробы термостатировали на водяной бане при 37 °С в течение 1 ч. Далее проводили процедуру пробоподготовки. О наличии глюкуроноконъюгатов судили по изменению концентрации неизменённого соединения в образцах плазмы крови и мочи после обработки ферментом в сравнении с образцами, пробоподготовка которых не включала обработку β-глюкуронидазой.

На основании полученных концентраций АЛМ-802 в плазме крови крыс модельно-независимым методом рассчитывали его основные фармакокинетические параметры:

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (нг/мл×ч) – площадь под фармакокинетической кривой (площадь под кривой «концентрация аналита – время») после в/ж или в/в введения.

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ рассчитывается от момента введения аналита до бесконечности;

C_{max} (нг/мл) – максимальная концентрация лекарственного вещества (ЛВ) в плазме крови после в/ж введения;

T_{max} (ч) – время достижения C_{max} после в/ж введения;

C_0 – кажущаяся C_{max} ЛВ в плазме крови после в/в введения;

Cl , Cl/F (л/ч/кг) – общий плазменный клиренс; V_d , V_d/F (л/кг) – кажущийся объём распределения; k_{el} (ч⁻¹) – константа скорости элиминации; $t_{1/2el}$ (ч) – период полувыведения, MRT (ч) – среднее время удерживания ЛВ в организме;

f_{abs} – абсолютная биодоступность, которую рассчитывали по формуле:

$$f_{abs} = (AUC_{0 \rightarrow \infty} \text{ в/ж} \times D_{\text{в/в}}) / (AUC_{0 \rightarrow \infty} \text{ в/в} \times D_{\text{в/ж}}) \times 100 \%,$$

где $AUC_{0 \rightarrow \infty} \text{ в/ж}$ – АUC после в/ж введения,

$AUC_{0 \rightarrow \infty} \text{ в/в}$ – АUC после в/в введения,

$D_{\text{в/в}}$ и $D_{\text{в/ж}}$ – доза соединения после в/в и в/ж введения, соответственно.

Результаты исследования / Results of the study

На рис. 1 представлены усреднённые фармакокинетические профили соединения АЛМ-802 в плазме крови крыс после однократного в/ж и в/в введения дозах 100 и 10 мг/кг, соответственно. Фармакокинетические параметры АЛМ-802 после различных путей введения представлены в табл. 1. Поскольку на каждую временную точку использовали по 5 животных, результирующая фармакокинетическая кривая была построена по усреднённым концентрациям, поэтому при расчётах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов.

Анализируемое вещество после в/ж введения определялось в плазме крови на протяжении 12 ч. Снижение концентраций после достижения максимального значения носит монофазный характер. Как видно из рисунка 1, соединение АЛМ-802 быстро всасывается из

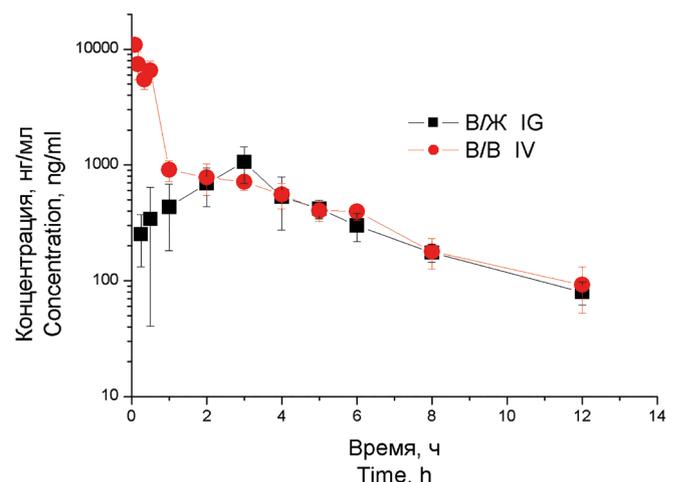


Рис. 1. Усреднённые фармакокинетические профили АЛМ-802 в плазме крови крыс после однократного внутрижелудочного (в/ж) и внутривенного (в/в) введения дозах 100 и 10 мг/кг ($n = 5$; $M \pm m$)

Figure 1. Average pharmacokinetic profiles of ALM-802 in rat blood plasma after a single intragastric (IG) and intravenous (IV) administration at doses of 100 and 10 mg/kg ($n = 5$; $M \pm m$)

Таблица 1

Фармакокинетические параметры АЛМ-802 в плазме крови крыс после однократного внутрижелудочного (в/ж) и внутривенного (в/в) введения субстанции АЛМ-802 в дозе 100 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно

Table 1

Pharmacokinetic parameters of ALM-802 in rat blood plasma after a single intragastric (IG) and intravenous (IV) administration of ALM-802 substance at a dose of 100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively

Параметр / Parameter	Единицы Измерения / Dimensions	Путь введения / Administration route	
		в/ж /IG	в/в /IV
C_0	нг/мл	—	15427,87
C_{max}	нг/мл	1064,79	—
T_{max}	ч	3,0	—
k_{el}	ч ⁻¹	0,2705	0,2194
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	нг/мл×ч	4648,86	10448,45
$t_{1/2el}$	ч	2,6	3,2
MRT	ч	4,9	4,6
Cl	л/ч/кг	—	0,957
Cl/F	л/ч/кг	21,511	—
V_d	л/кг	—	4,361
V_d/F	л/кг	79,52	—
f_{abc}	%	4,45	—

ЖКТ в системный кровоток и определяется в плазме крови уже через 15 мин. Максимальная концентрация (C_{max}) АЛМ-802 в плазме крови (1064,79 нг/мл) достигалась через 3,0 ч (T_{max}) после введения (см. табл. 1). Соединение АЛМ-802 достаточно медленно выводится из организма животных. Об этом свидетельствуют значения следующих фармакокинетических параметров: период полувыведения ($t_{1/2el}$) исследуемого вещества составил 2,6 ч, а среднее время удерживания вещества в организме животных (MRT) — 4,9 ч.

Параметром, характеризующим степень проникновения ЛВ в ткани, является кажущийся объём распределения (V_d/F). Его величина для крыс составила 79,52 л/кг. Крайне высокое значение данного параметра указывает, что АЛМ-802 распределяется во всех жидких средах организма животных.

Фармакокинетика соединения АЛМ-802 после его в/в введения крысам существенно отличается от кинетики в/ж введения, прежде всего более высокими концентрациями неизменённого соединения (см. рис. 1). После в/в введения соединение АЛМ-802 так же как и в случае в/ж введения определяется в плазме крови на протяжении 12 ч. Из рис. 1 видно, что после в/в способа введения в плазме крови наблюдается двухфазное снижение концентраций исследуемого соединения. На протяжении первой фазы (с момента введения до 1 ч после введения) концентрация неизменённого со-

единения упала с 15 427,87 нг/мл (кажущаяся начальная концентрация — C_0 , т. е. концентрация АЛМ-802 в момент введения) до $907,26 \pm 183,72$ нг/мл, т. е. в 17 раз. Терминальная часть фармакокинетической кривой была аналогична таковой после в/ж введения. Об этом свидетельствуют значения констант скорости элиминации (k_{el}) (0,2194 и 0,2705 ч⁻¹, соответственно). Такие фармакокинетические параметры, как $t_{1/2el}$ равный 3,2 ч и MRT — 4,6 ч, указывают на относительно длительное нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных. Таким образом, полученные результаты по изучению фармакокинетики соединения АЛМ-802 позволяют заключить, что исследуемое ЛВ элиминирует из организма животных с невысокой скоростью и его можно отнести к группе «долгоживущих».

Абсолютная биодоступность (f_{abc}) соединения АЛМ-802 после в/ж введения составила 4,45 %. Невысокую абсолютную биодоступность АЛМ-802 можно объяснить тем, что после в/ж введения соединение подвергается эффекту «первого прохождения» через печень с образованием глюкуроноконъюгированных метаболитов. В то же время после в/в введения этот эффект выражен в меньшей степени, и в плазме крови, в основном, регистрируется исходное соединение. В пользу этого утверждения говорят результаты изучения биотрансформации триметазида. АЛМ-802 можно рассматривать как структуру, содержащую в своей молекуле двойной 2,3,4-триметоксибензиловый фрагмент триметазида (рис. 2):

Метаболизм триметазида в плазме крови и моче человека подробно описан [2, 3]. Одно из направлений биотрансформации заключается в образовании метаболитов за счёт деметилирования метоксигруппы

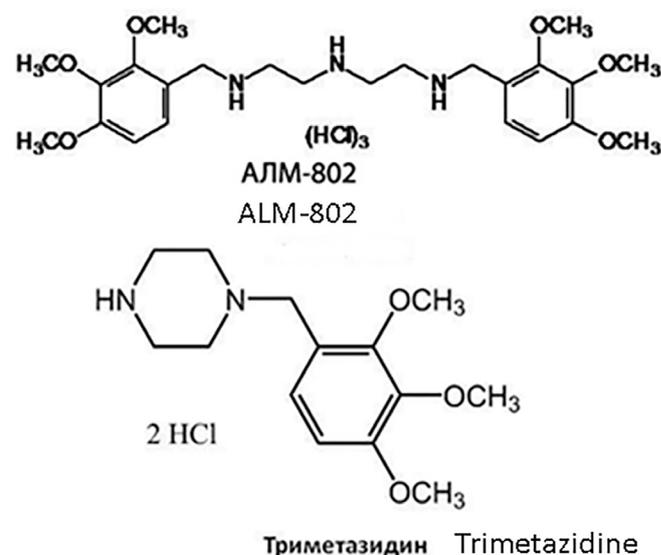


Рис. 2. Структурные формулы соединения АЛМ-802 и триметазида
Figure 2. Structural formulas of ALM-802 and trimetazidine

2,3,4-триметоксибензиловой части молекулы триметазидина с последующей конъюгацией до *O*-глюкуронида и *O*-сульфата.

В то же время нами были проведены исследования подтверждающие, что соединение АЛМ-802 после в/ж введения подвергается выраженному эффекту «первого прохождения» через печень с образованием глюкуроноконъюгированных метаболитов. Полученные результаты показали, что после обработки ферментом концентрация неизменённого соединения в образцах

плазмы крови выросла на 26–63%. В то же время в образцах суточной мочи, не обработанных ферментом, соединение АЛМ-802 обнаружено не было. После добавления к этим пробам β-глюкуронидазы регистрировались высокие концентрации АЛМ-802.

В результате проведённого исследования необходимо отметить, что абсолютная биодоступность соединения АЛМ-802 после в/ж введения, составившая 4,45 % говорит о потенциальной возможности разработки лекарственной формы для приёма внутрь.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кольванов Геннадий Борисович

e-mail: 7822535@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>

SPIN-код: 2538-8639

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kolyvanov Gennadiy B.

e-mail: 7822535@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>

SPIN code: 2538-8639

D. Sci. in Biology, Leading researcher of the laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Бочков Павел Олегович

e-mail: bok-of@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8555-5969>

SPIN-код: 5576-8174

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Bochkov Pavel O.

e-mail: bok-of@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8555-5969>

SPIN code: 5576-8174

PhD in Biology, Senior Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литвин Александр Алексеевич

Автор, ответственный за переписку

e-mail: litbiopharm@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>

SPIN-код: 6193-5770

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Litvin Alexander A.

Corresponding author

e-mail: litbiopharm@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>

SPIN code: 6193-5770

D. Sci. in Biology, Leading researcher of the laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Шевченко Роман Владимирович

e-mail: rmn.shev@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4646-7733>

SPIN-код: 1844-6202

к. м. н., н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Shevchenko Roman V.

e-mail: rmn.shev@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4646-7733>

SPIN code: 1844-6202

PhD in Medicine, Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Подолько Анна Леонидовна

e-mail: podolko.a.l@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2418-8055>

SPIN-код: 4707-3068

м. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Podolko Anna L.

e-mail: podolko.a.l@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2418-8055>

SPIN code: 4707-3068

Junior Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Жердев Владимир Павлович

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>

SPIN-код: 2213-9592

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Zherdev Vladimir P.

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>

SPIN code: 2213-9592

D. Sci. in Medicine, professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. Скрининг кардиотропной активности в ряду α, ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2016;(2):10–13. [Kryzhanovskii SA, Likhosherstov AM, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Mokrov GV, Gudasheva TA. Screening of the compounds having cardiotropic activity among the α, ω -diarilmethyl derivatives of bis-

(ω -aminoalkyl)amines. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2016;(2):10–13. (In Russ).]

2. Jackson PJ, Brownsill RD, Taylor AR. Identification of trimetazidine metabolites in human urine and plasma. *Xenobiotica*. 1996;26(2):221–228. DOI: 10.3109/00498259609046702.

3. Jeoung MK, Kim KS, Kim CS, Kim NH. An HPLC Determination of Trimetazidine in Human Plasma Using Liquid-Liquid Extraction for Sample Clean-Up. *J Liq Chrom Relat Tech*. 2005;28(9):1299–1309. DOI: 10.1081/JLC-200054785