

РАЗРАБОТКА ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОГО КАЛЬКУЛЯТОРА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕГО ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НОВОГО НЕСТЕРОИДНОГО ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА ИЗ ГРУППЫ ПРОИЗВОДНЫХ ТИАДИАЗОЛА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

- Автор: Варпетян Эдуард Эмильевич, аспирант кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова.

Электронный адрес: science55569@mail.ru

Актуальность

- Нестероидные противовоспалительные средства являются одними из наиболее востребованных лекарственных препаратов на фармацевтическом рынке (рис. 1).

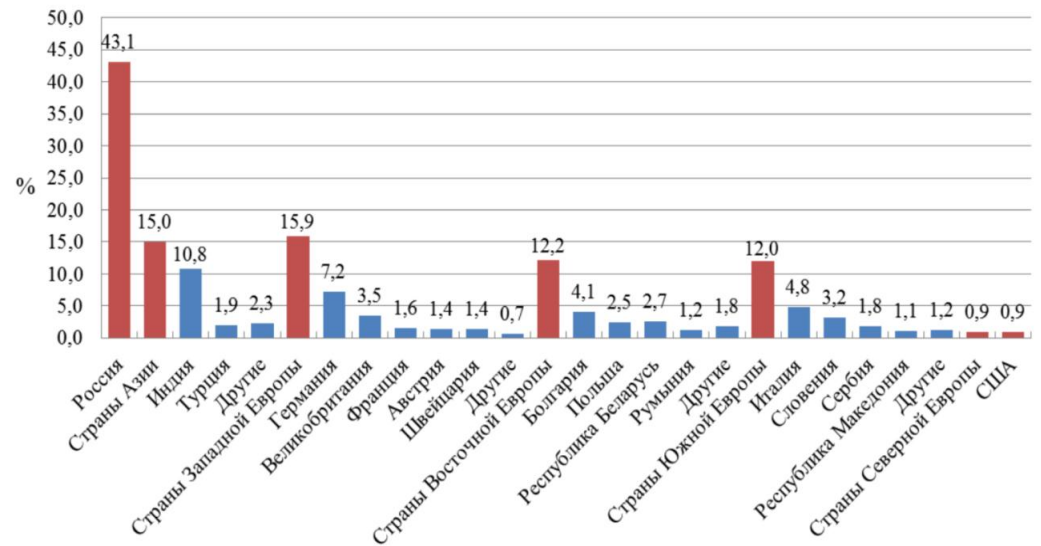


Рис. 1. Сегментация зарегистрированных НПВП по странам производителям

- В процессе фармакокинетических исследований необходим расчет целого ряда фармакокинетических параметров. Для облегчения и ускорения подобных расчетов целесообразным является использование фармакокинетических калькуляторов. Существенным недостатком существующих фармакокинетических калькуляторов является необходимость оплаты за их использование, так как версии бесплатного пользования ограничены функционалом.

Цель

- Разработка фармакокинетического калькулятора и использование его для экспериментальных фармакокинетических исследований нитробензоламида – нового нестероидного противовоспалительного средства из группы производных тиадиазола методом ВЭЖХ-МС/МС.

Задачи

- Рассчитать дозы НПВС для внутривенного и внутрижелудочного введения индивидуально для каждого подопытного животного.
- Забрать кровь и произвести пробоподготовку.
- Определить содержание нитробензоламида в плазме крови.
- Сбор фармакокинетических параметров для разработки фармакокинетического калькулятора на базе пакета программ Microsoft Office Excel 2013.
- С помощью разработанного фармакокинетического калькулятора рассчитать основные фармакокинетические параметры для нового производного тиадиазола – нитробензоламида.

Материалы и методы

- Объектом исследования явился нитробензоламид – новое производное 1,3,4-тиадиазола, синтезированное в ОАО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна) проф. С.Я. Скачиловой (рис. 2).
- По внешнему виду порошок белого цвета, без запаха, растворим в воде, практически не растворим в органических растворителях, легко растворим в ацетонитриле.

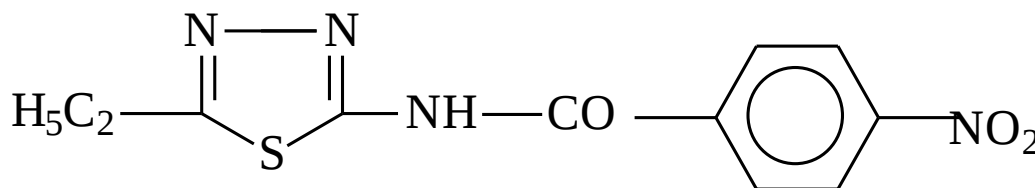


Рис. 2. Химическая структура нитробензоламида – нового нестероидного противовоспалительного средства из группы производных тиадиазола (химическая структура 2-(5-этил-1,3,4-тиадиазолил) амид 4-нитробензойной кислоты; молярная масса 278,3 г/моль).

- За 12 часов до начала и в течение эксперимента подопытных животных не кормили, не ограничивая им доступ к воде. Перед постановкой эксперимента животные проходили карантин в течение 10-14 дней.
- Фармакокинетические исследования проводили на 6 кроликах породы русский великан массой $3,9 \pm 0,2$ кг. Подопытных животных содержали в стандартных условиях вивария: при двенадцатичасовом режиме освещения и доступе к воде *ad libitum*.

Материалы и методы

- Исследование проводили по открытой рандомизированной перекрёстной схеме. Период вымывания препарата между этапами составил 7 дней.
- Нитробензоламид вводили подопытным кроликам однократно внутрижелудочно (через зонд) в дозе 10 мг/кг в 20 мл 2% слизи крахмала или внутривенно в дозе 1 мг/кг в 0,33% растворе димексида. Забор крови осуществляли через катетер из вены уха в обработанные натриевой солью гепарина пробирки в объеме 1 мл до начала исследования и через 0,016; 0,08; 0,16; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 24 и 36 часов после введения исследованных соединений (рис. 3).



Рис . 3. Забор крови через катетер из вены уха подопытного кролика.

Материалы и методы

- Продолжительность мониторинга концентрации нитробензоламида в плазме крови в среднем в 5 раз превышала период полувыведения ($T_{1/2}$).
- Кровь центрифугировали в течение 10 минут при скорости 3000 оборотов в минуту. В процессе центрифугирования происходило осаждение форменных элементов крови. Плазму крови с помощью пипеток переносили в химически чистые промаркированные пробирки (рис. 4)



Рис. 4. Получение плазмы крови методом центрифугирования.

Материалы и методы

- Полученную плазму крови хранили при температуре -40°C .
- Для пробоподготовки был выбран метод осаждения белков плазмы крови ацетонитрилом. Для этого к 450 мкл исследуемого образца плазмы крови добавляли 100 мкл стандартного раствора ацексазоламида в 50% ацетонитриле и 450 мкл ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты. Для приготовления бланка к 450 мкл плазмы крови добавляли 500 мкл ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты и 50 мкл воды деионизированной.



Рис. 5. Планшеты с промаркированными пробирками, содержащими гепаринизированную кровь.

Пробы встряхивали на вортекс-шейкере, термостатировали 20 минут при температуре 37°C , далее центрифугировали в течение 10 минут при 18000 об/мин, после чего надосадочную жидкость переносили в вials для хроматографа.

Материалы и методы

Количественное определение нитробензоламида в плазме крови осуществляли валидированным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) (Попов Н.С., Малыгин А.С., Демидова М.А., 2017). Исследование осуществляли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, ФРГ).

В качестве детектора использовали тройной квадрупольный масс-спектрометр AB Sciex QTrap 3200 MD (AB Sciex, Сингапур) с электрораспылительным источником ионов (Turbo V с зондом TurboIonSpray). Калибровку масс-спектрометра проводили с помощью тестового раствора резерпина в концентрации $6,1 \times 10^{-2}$ мг/л.

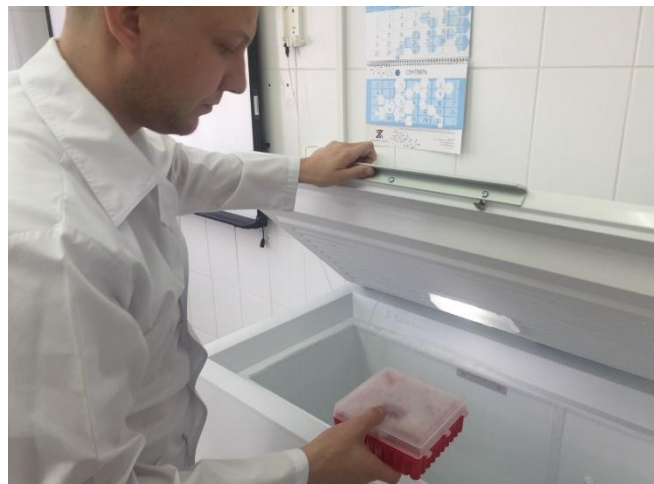


Рис. 6. Холодильное оборудование для хранения биологического материала при температуре -40°C .

Материалы и методы

Валидация методики количественного определения нитробензоламида в плазме крови была проведена в соответствии с требованиями Общей фармакопейной статьи ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методов, а также с использованием отечественных и международных рекомендаций по валидации биоаналитических методов.

Для хроматографирования использовали следующие условия: неподвижная фаза – аналитическая колонка Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,7 мкм 4,6×100 мм при температуре 40 °С; подвижная фаза – смесь ацетонитрила и воды деионизированной в соотношении 30:70 с добавлением 0,1% муравьиной кислоты; скорость потока подвижной фазы – 0,6 мл/мин; объем вводимой пробы – 10 мкл; общее время изократического элюирования – 4 минуты. При использовании данных условий хроматографии время удерживания для аналита составило 2,7 минуты.

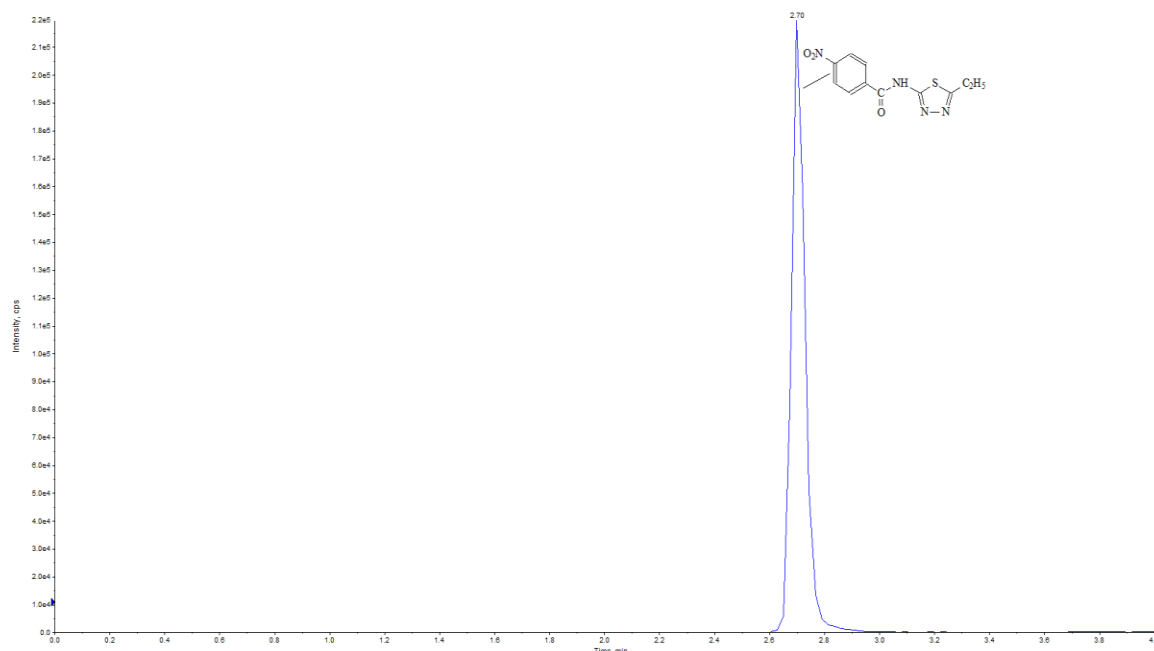


Рис . 7. Полная ионная хроматограмма нитробензоламида (колонка InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,7 мкм 4,6×100 мм, изократическое элюирование 30% ацетонитрила, скорость потока 0,6 мл/мин).

Материалы и методы

- Детектирование нитробензоламида осуществляли масс-спектрометрически, используя электрораспылительный источник ионов (Turbo V с зондом TurboIonSpray).
- Для получения устойчивой масс-спектрограммы были использованы следующие условия детектирования: отрицательная поляризация, напряжение электроспрея – 5500,0 В, потенциал декластеризации – 280,0 В при давлении газа завесы 20,0 psi и газа распыления 40,0 psi, скорость 10 мкл/мин. Потенциал ввода для всех ионов составил -4,5 В, диапазон сканирования 200 – 300 Да.

Результаты

Фаза	№ животного	Исходные данные						Среднее
		1	2	3	4	5	6	
		Время, ч	Концентрация в крови, мкг/мл					
α	0,004	56,2	51,1	58,8	54,3	50,7	58,8	54,9833
	0,016	40,2	43	46,8	44,2	41,9	44,4	43,4167
	0,083	20,4	23,8	25,2	26,1	20,6	24,2	23,3833
β	0,25	6,1	7,3	7,8	6,9	6,5	6,3	6,81667
	0,5	5,6	5,9	5,2	4,2	4,5	4,4	4,96667
	0,75	4,5	4,5	4,7	4,2	4,1	3,6	4,26667
	1	3,6	3,8	3,5	3,4	3,7	3,4	3,56667
	1,5	2,4	2,7	3,64	4,8	2,8	3,6	3,32333
	2	2,8	2,1	3,5	4,1	2,7	3,4	3,1
	3	2,62	2,1	2,8	3,1	2,6	2,9	2,68667
	4	2,5	2,3	2,3	2,5	2,2	2,5	2,38333
	6	2,1	2,3	2,2	2,4	2,1	2,2	2,21667
	8	1,8	1,9	2	2,1	2	1,9	1,95
	10	1,6	1,7	1,9	1,8	1,7	1,4	1,68333
	12	1,3	1,5	1,6	1,4	1,4	1,25	1,40833
	24	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		Масса животного, кг	3,52	3,86	3,44	3,56	3,61	3,72
	Доза, мкг/кг	1000						K21
	Доза, мкг	3520	3860	3440	3560	3610	3720	Ke

Рис. 8. Ячейки фармацевтического калькулятора с первичными данными (концентрация нитробензоламида в плазме крови в различные временные интервалы после внутривенного введения).

- На первом этапе исследования нами был разработан фармакокинетический калькулятор на базе пакета программ Microsoft Office Excel 2013. С этой целью в разработанном калькуляторе были предусмотрены ячейки для ввода первичных данных (концентрация исследуемого вещества в крови в определенные периоды времени) (рис. 8).
- Для всех данных введены формулы, позволяющие осуществлять статистическую обработку данных: расчет среднеарифметических (Mean) и среднегеометрических (GMean) значений, стандартного отклонения (SD), коэффициента вариации (CV, %), медианы (Median) и их интервальной оценки (Доверит, L-90%, U-90%), максимальное (Max) и минимальное (Min) значение.

Результаты

- На основании данных о содержании нитробензоламида в крови были построены фармакокинетические кривые зависимости концентрации нитробензоламида в плазме крови от времени (рис. 9)

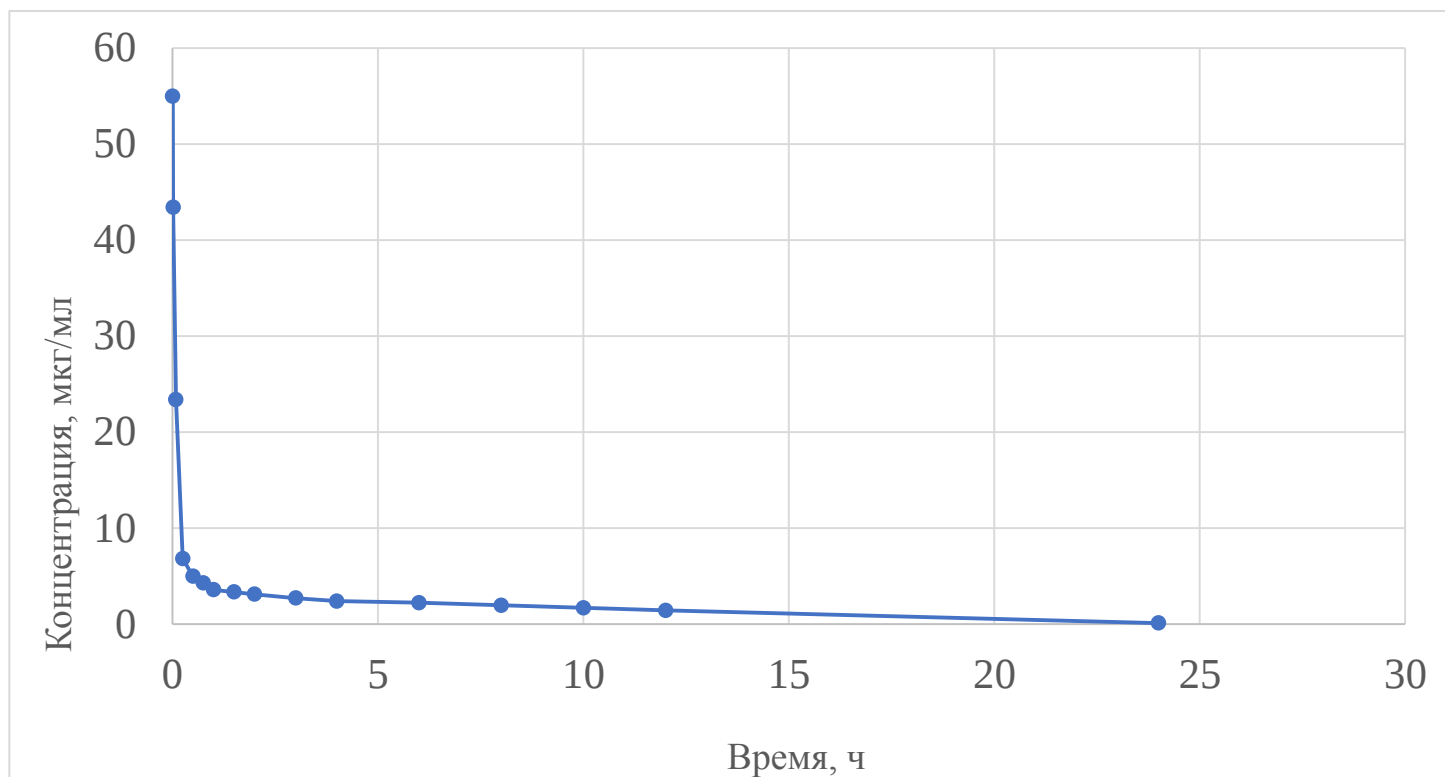


Рис. 9. Фармакокинетическая кривая зависимости концентрации нитробензоламида в плазме крови от времени при его внутривенном введении в дозе 1 мг/кг.

Результаты

- Фармакокинетические параметры определяли внемоделным способом.
- Рассчитаны следующие внемоделные параметры: $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ и $AUC_{0 \rightarrow t}$ (площади под фармакокинетической кривой); $T_{1/2}$ (период полувыведения), C_{max} (максимальная концентрация), t_{max} (время достижения максимальной концентрации), Cl (клиренс), K_{el} (константа элиминации), V_d (кажущийся объем распределения), MRT (время удерживания вещества в плазме), 95% CI (границы 95% доверительного интервала).
- На рис.10 Представлены результаты расчета площадей под фармакокинетической кривой в различные временные интервалы $AUC_{0 \rightarrow t}$ и $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, клиренса (Cl) и объема распределения (V_d).

Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF
	AUC						
	1	2	3	4	5	6	Среднее
	0,5784	0,5646	0,6336	0,591	0,5556	0,6192	0,5904
	2,0301	2,2378	2,412	2,35505	2,09375	2,2981	2,2378
	2,21275	2,59685	2,7555	2,7555	2,26285	2,54675	2,5217
	1,4625	1,65	1,625	1,3875	1,375	1,3375	1,472917
	1,2625	1,3	1,2375	1,05	1,075	1	1,154167
	1,0125	1,0375	1,025	0,95	0,975	0,875	0,979167
	1,5	1,625	1,785	2,05	1,625	1,75	1,7225
	1,3	1,2	1,785	2,225	1,375	1,75	1,605833
	2,71	2,1	3,15	3,6	2,65	3,15	2,893333
	2,56	2,2	2,55	2,8	2,4	2,7	2,535
	4,6	4,6	4,5	4,9	4,3	4,7	4,6
	3,9	4,2	4,2	4,5	4,1	4,1	4,166667
	3,4	3,6	3,9	3,9	3,7	3,3	3,633333
	2,9	3,2	3,5	3,2	3,1	2,65	3,091667
	8,4	9,6	10,2	9	9	8,1	9,05
AUC0-∞	40,50793	42,40069	45,92747	45,92786	41,28218	41,54805	42,93236
Cl	86,89656	91,03626	74,9007	77,51287	87,44692	89,53489	84,5547
Vd(центр)	64,78563	74,44349	58,63815	66,01294	69,42338	64,82552	66,35485
MAR	500 100	677 1012	500 0000	514 5240	607 7472	601 7772	572 644

Рис. 10. Результаты фармакокинетических исследований: расчет значений площади под фармакокинетической кривой, клиренса и объема распределения.

Результаты

- Разработанный калькулятор позволяет оценивать фармакокинетические параметры модельным методом на основе 2-хкамерной модели.

R	S	T	U	V	W	X
Концентрация в периферической камере						
1	2	3	4	5	6	Среднее
2,404278	1,742982	2,172345	1,696303	2,142673	2,159443	2,053004
8,845407	6,5294	8,088819	6,376319	7,925153	8,032108	7,632868
30,01123	24,09725	29,00969	23,92027	27,55429	28,66121	27,20899
41,3631	37,01176	42,82677	37,60294	39,11362	42,03334	39,99192
41,08074	38,07075	43,37625	39,01794	39,17758	42,48305	40,53438
39,63164	36,8668	41,88993	37,78501	37,84679	41,0243	39,17408
38,2004	35,56278	40,35834	36,40403	36,51153	39,52948	37,76109
35,48923	33,07387	37,4517	33,7639	33,97708	36,69323	35,07484
32,97045	30,75855	34,75417	31,31412	31,61849	34,06029	32,57934
28,45649	26,6028	29,92799	26,93489	27,38113	29,34764	28,10849
24,56053	23,00853	25,772	23,16809	23,71163	25,28704	24,25131
18,29577	17,21123	19,11126	17,14117	17,78205	18,7736	18,05251
13,62899	12,87464	14,17198	12,68208	13,33528	13,93789	13,43848
10,15259	9,630706	10,50925	9,382979	10,00052	10,34777	10,00397
7,562923	7,204124	7,793152	6,9421	7,499681	7,682387	7,447394
1,292312	1,262175	1,295868	1,138654	1,334027	1,286452	1,268248
4,706749	4,774325	4,635284	4,600174	4,81624	4,653499	4,697712

Рис. 11. Концентрация нитробензоламида в периферической камере.

АН	АІ	АІ	АК	АL	АМ	АN
Концентрация в центральной камере						
1	2	3	4	5	6	Среднее
51,61471	49,83041	56,16463	51,95754	49,57066	54,88396	52,33698
44,32207	44,27297	49,34552	46,51116	43,00625	48,07336	45,92189
20,14104	23,70558	25,02118	25,91898	20,52938	23,94089	23,20951

Рис. 12. Концентрация нитробензоламида в центральной камере.

- 2-х камерная модель представлена центральной камерой (кровь и интерстициальная жидкость) и периферической камерой (внутренние органы).
- На рис. 11 и 12 представлены результаты расчета концентрации и нитробензоламида для центральной и периферической камер.

Результаты

- Результаты расчета фармакокинетических параметров при внутривенном введении кроликам нитробензоламида в дозе 1 мг/кг приведены на рис. 13.

Результаты			
$\alpha, 1/\text{ч}$	12,1506695	$AUC_{0-\infty}, \text{мкг} \cdot \text{час}/\text{мл}$	42,93236
$\beta, 1/\text{ч}$	0,14755784	$AUC_{0-24}, \text{мкг} \cdot \text{час}/\text{мл}$	42,25448
A_1	49,5989685	$AUC_{24-\infty}/AUC_{0-24}, \%$	1,609401
A_2	5,09482001		
B_1	-43,7682654		
B_2	43,7682654		
$C_0, \text{мкг}/\text{мл}$	54,6937885		
$k_{21}, 1/\text{ч}$	1,26205115		
$k_{12}, 1/\text{ч}$	9,61824686		
$k_e, 1/\text{ч}$	1,41792932		
$t_{1/2}, \text{ч}$	4,69771178		
$V_d(\text{центр}), \text{мл}/\text{кг}$	66,3548512		
$V_d\beta, \text{мл}/\text{кг}$	573,643957		
$V_{\text{extrap}}, \text{мл}/\text{кг}$	713,481463		
$V_{ss}, \text{мл}/\text{кг}$	570,539362		
$Cl, \text{мл}/\text{час} \cdot \text{кг}$	84,5547009		

Рис. 13. Результаты расчета фармакокинетических параметров при внутривенном введении кроликам нитробензоламида в дозе 1 мг/кг.

Выводы

- Разработан фармакокинетический калькулятор для расчета фармакокинетических параметров, который можно использовать как при проведении экспериментально-исследовательской работы, так и в клинической практике для оценки изучения фармакокинетики лекарственных препаратов (оценка биоэквивалентности лекарственных препаратов, клинические фармакокинетические исследования, индивидуальный фармакокинетический профиль).
- Определено содержание нитробензоламида – нового нестероидного противовоспалительного средства из группы производных тиадиазола в плазме крови кроликов при однократном внутривенном и внутрижелудочном применении с помощью валидированного метода ВЭЖХ-МС/МС.
- С помощью разработанного фармакокинетического калькулятора рассчитаны основные фармакокинетические параметры для нового производного тиадиазола – нитробензоламида.