

ФАРМАКОКИНЕТИКА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА СУБСТАНЦИЙ ДИПЕПТИДНОГО АНКСИОЛИТИКА ГБ-115

Л. Г. Колик, В. П. Жердев, С. С. Бойко, М. А. Константинопольский,
С. Ю. Раскин, Т. А. Гудашева, В. А. Мартъянов, С. Б. Середенин¹

Изучена фармакокинетика и фармакологическая активность дипептидного анксиолитика ГБ-115 при пероральном введении в виде кристаллической и микронизированной субстанций у беспородных белых крыс. В отличие от кристаллической, микронизированная субстанция ГБ-115 обладала лучшими фармакокинетическими параметрами, в том числе высокой биодоступностью. При оценке тревожности в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” показано, что ГБ-115 в дозе 0,3 мг/кг в виде микронизированной субстанции проявлял выраженные анксиолитические свойства в течение более длительного времени по сравнению с кристаллической субстанцией. Полученные результаты позволяют рекомендовать микронизированную субстанцию ГБ-115 для включения в фармацевтическую композицию при создании лекарственной формы нового пептидного анксиолитика.

Ключевые слова: фармакокинетика; дипептид ГБ-115; кристаллическая и микронизированная субстанции; анксиолитик; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

При создании новых лекарственных средств необходимым этапом доклинического исследования является изучение их фармакокинетики для расчета скорости и степени всасывания, периода полувыведения, величины биодоступности [3]. Фармакокинетические исследования необходимы для выбора способа введения изучаемого препарата, что особенно важно для пептидных соединений, а также для разработки оптимальной лекарственной формы [6].

Известно, что фармацевтические факторы оказывают существенное влияние на биодоступность и фармакологическую активность лекарственных веществ. Степень измельчения активной субстанции определяет скорость растворения, абсорбцию и терапевтический эффект лекарственного препарата [4].

В ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” на основе структуры эндогенного тетрапептида холецистокинина разработан и фармакологически изучен новый дипептидный препарат ГБ-115 [2], обладающий анксиолитической активностью при пероральном введении у крыс и мышей [5]. Однако ГБ-115 относится к труднорастворимым лекарственным веществам, что ограничивает скорость его всасывания. С помощью электронной микроскопии было показано, что субстанция ГБ-115 имеет кристаллы анизометрической формы с широким распределением частиц по размерам и склонна к образованию агломератов размером более 500 мкм. Для повышения растворимости и био-

доступности ГБ-115 в опытно-технологическом отделе ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” проведена микронизация субстанции ГБ-115 с использованием сверхкритической флюидной технологии, что позволило уменьшить размер частиц до 10 мкм с однородным распределением частиц по размерам [7].

Целью настоящей работы явилось изучение в эксперименте у крыс фармакокинетики и анксиолитической активности кристаллической и микронизированной субстанций ГБ-115 при пероральном введении.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах ($n = 210$, масса тела 220 – 250 г, ФГБНУ “Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства”, филиал “Столбовая”). Животных содержали по 8 особей в клетке (580 × 375 × 200 мм) в стандартных условиях вивария ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” при контролируемом освещении (12 ч — свет/12 ч — темнота) и постоянной температуре (21 – 23 °С) со свободным доступом к воде и брикетированному корму в течение 10 сут до начала тестирования в соответствии с приказом МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 “Об учреждении Правил лабораторной практики”.

В качестве стандарта использованы кристаллическая и микронизированная фармацевтические субстанции ГБ-115 (амид N-фенилгексаноил-глицил-L-триптофана), содержание основного вещества в которой было не ниже 99 %. Субстанции ГБ-115 использовали

¹ ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

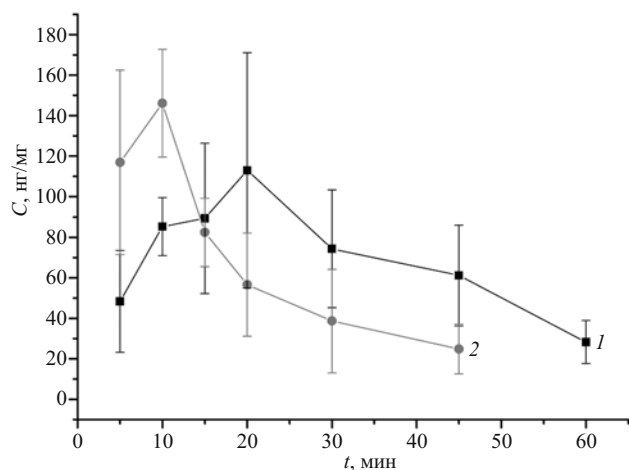


Рис. 1. Фармакокинетические кривые ГБ-115 после однократного перорального введения в дозе 100 мг/кг микроинкапсулированной (1) и кристаллической (2) субстанций (*Mean ± SD*).

Примечание: по оси абсцисс представлено время, мин (*t*, мин), по оси ординат — концентрация, нг/мл (*c*, нг/мл).

в виде водно-твинового раствора и дистиллированную воду с твин-80 в качестве контроля.

Исследования фармакокинетики проводили на здоровых бодрствующих животных (*n* = 90). До проведения исследования животные находились в течение 12 ч на водной диете. Фармакокинетические параметры ГБ-115 изучали после перорального введения крысам субстанций в дозе 100 мг/кг. Животных декапитировали через 10, 15, 20, 30, 45 и 60 мин после введения препарата. Плазму получали центрифугированием образцов крови при 5000 об/мин в течение 10 мин. Экстракцию ГБ-115 из биологических образцов проводили следующим способом: к 1 мл плазмы крови крыс, содержащей ГБ-115, добавляли двукратный объём ацетонитрила для осаждения белков. Водно-ацетонитрильный раствор центрифугировали при *T* = 2 °С со скоростью 4000 об/мин в течение 10 мин. Далее отбирали очищенную от белков плазму, добавляли 5 мл диэтилового эфира, встряхивали в течение 15 мин, отделяли эфирный слой и высушивали в токе азота досуха, остаток растворяли в элюенте и вводили в систему ВЭЖХ-УФ.

Анализ проб плазмы крови крыс проводили с использованием метода ВЭЖХ с УФ-детектором. Разделение проводили на жидкостном хроматографе, состоящем из изократической помпы SYSTEM COLD 127 (США), ультрафиолетового детектора и компьютера с соответствующим пакетом программ для обсчёта хроматограмм “Амперсенд” (Россия).

Хроматографическое разделение проводили на аналитической колонке Luna 5u C 18 (2) 100 А, 250 × 4,6 мм, детектировали при длине волны 282 нм, что позволило избежать влияния коэкстрактивных веществ, которые бы мешали определению ГБ-115. При использовании диапазона длин волн 200 – 230 нм наблюдается совпадение максимумов поглощения

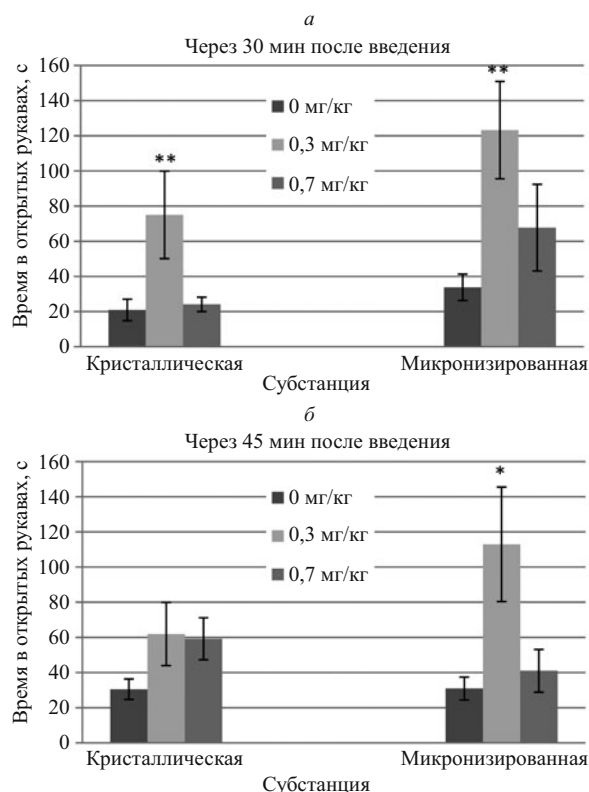


Рис. 2. Влияние ГБ-115 на поведение беспородных крыс в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” через 30 мин (а) и 45 мин (б) после введения внутрь (*Mean ± S.E.M.*).

* *p* < 0,05, ** *p* < 0,01 статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой, непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни; число животных в группе 10.

ГБ-115 и примесей, что и обусловило выбор максимума поглощения в УФ-свете при длине волны 282 нм. Подвижная фаза — ацетонитрил — вода (400:450), трифторуксусная кислота. Скорость потока подвижной фазы — 1 мл/мин, рН раствора составлял 3,2.

Хроматографический анализ проводили при комнатной температуре 22 – 24 °С. Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане, что позволило избежать дополнительных пиков во время анализа. Подвергавшуюся анализу пробу вводили при помощи микрошприца через инжектор в петлю хроматографа объёмом 100 мкл.

Основные фармакокинетические параметры рассчитаны модельно-независимым методом (программа “M-IND”) [1]:

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ — площадь под кривой “концентрация лекарственного вещества — время”, рассчитывается от момента введения до бесконечности, нг/мл · мин;

$AUC_{0 \rightarrow T}$ — площадь под фармакокинетической кривой, рассчитывается от момента введения до момента последней регистрации концентрации исследуемого соединения, нг/мл · мин;

C — концентрация препарата в плазме крови после перорального введения, нг/мл;

$T_{\text{макс}}$ — время достижения максимальной концентрации препарата в плазме крови после перорального введения, мин;

$C_{\text{макс}}$ — максимальная концентрация лекарственно-го вещества в плазме крови после перорального введения, нг/мл;

$C_{\text{макс}}/AUC$ — параметр, характеризующий скорость всасывания препарата в системный кровоток, мин^{-1} ;

Cl_{po} — плазменный клиренс, л/мин;

MRT — среднее время пребывания лекарственного вещества в организме, мин;

K_{el} — константа элиминации, параметр, характеризующий скорость выведения препарата из организма, мин^{-1} ;

$T_{1/2}$ — период, за который выводится половина введённой и всосавшейся дозы лекарственного вещества, мин;

V_{zpo} — гипотетический объём распределения, л;

F (%) — относительная биодоступность ($AUC_{0 \rightarrow T}(A) / AUC_{0 \rightarrow T}(B) \cdot 100\%$), где А — микронизированная субстанция, В — кристаллическая субстанция.

Исследование фармакодинамики выполнено на 120 крысах. В течение 3 сут до тестирования с животными проводили процедуру “хендлинга”. За 3–4 ч до начала опыта крыс помещали в экспериментальную комнату со слабым освещением, источник света (лампа мощностью 60 Вт) был экранирован, и сама установка освещалась отраженным рассеянным светом. ГБ-115 в дозах 0,3 мг/кг и 0,7 мг/кг в виде кристаллической и микронизированной субстанций вводили перорально из расчета 0,1 мл/100 г массы тела животных за 30 и 45 мин до тестирования. Оценку анксиолитической активности проводили в стандартном тесте для оценки тревожности “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) [10]. Животных помещали на центральную площадку и в течение последующих 300 с фиксировали основные пространственно-временные параметры, а именно время пребывания в открытых рука-

вах, число выходов в открытые рукава, число заходов в закрытые рукава. Увеличение времени нахождения в открытых рукавах при отсутствии изменений двигательной активности (общее число заходов в открытые и закрытые рукава) рассматривали как проявление анксиолитического эффекта.

Полученные экспериментальные данные были математически обработаны с помощью программы “Excel.11.0”. Результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок и в виде средних арифметических и их стандартных отклонений. Оценку достоверности полученных данных проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни для независимых групп. Критический уровень значимости $\alpha = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фармакокинетические исследования

Фармакокинетические кривые ГБ-115 в дозе 100 мг/кг в виде кристаллической и микронизированной субстанций представлены на рис. 1.

Показано, что при пероральном введении ГБ-115 в виде микронизированной и кристаллической субстанций быстро всасывается и поступает в системный кровоток, и уже через 5 мин в плазме крови крыс регистрируются значительные концентрации анализируемого вещества, что возможно связано с наличием в ЖКТ активных переносчиков ди- и трипептидов [8, 9]. Время регистрации соединения ГБ-115 в плазме крови крыс колеблется до 45 и 60 мин для кристаллической и микронизированной субстанций, соответственно. Максимумы концентраций ГБ-115 наблюдаются через 10 мин после введения кристаллической и через 20 мин после введения микронизированной субстанций. Исходя из данных рис. 1, можно сделать вывод о том, что после введения кристаллической субстанции регистрируются более высокие концентрации ГБ-115 в течение первых 15 мин, но в последующие интервалы времени концентрации соединения снижаются, и их значения становятся ниже, чем концентрации после введения микронизированной субстанции.

В таблице представлены фармакокинетические параметры субстанций ГБ-115 у крыс.

Как видно из данных, приведённых в таблице, время достижения максимальной концентрации ГБ-115 после введения кристаллической субстанции в дозе 100 мг/кг в плазме крови крыс составило 10 мин, а её величина — 146,16 нг/мл. Максимальная же концентрация ГБ-115 после введения микронизированной субстанции в той же дозе составила 113,02 нг/мл и достигалась через 20 мин.

Анализ параметров кинетики позволяет заключить, что ГБ-115 быстро выводится из организма после перорального введения микронизированной и в большей степени кристаллической субстанций, на что указывают значения констант скорости элиминации из плазмы

Фармакокинетические параметры ГБ-115 у крыс после перорального введения кристаллической и микронизированной субстанций

Параметр	Субстанция ГБ-115	
	кристаллическая	микронизированная
$AUC_{0 \rightarrow T}$, нг/мл · мин	2821,050	4019,415
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, нг/мл · мин	3279,311	4983,617
$T_{\text{макс}}$, мин	10	20
$C_{\text{макс}}$, нг/мл	146,16	113,022
$C_{\text{макс}}/AUC$, мин^{-1}	0,052	0,028
Cl_{po} , л/мин	6,099	4,013
K_{el} , мин^{-1}	0,0471	0,0323
$T_{1/2}$, мин	14,73	21,49
MRT, мин	23,83	39,87
V_{zpo} , л	129,60	124,40
F , %	—	142,48

крови (K_{el}), которые составили 0,0323 и 0,0471 мин⁻¹ соответственно. Выведение ГБ-115 из плазмы крови животных также характеризуется такими фармакокинетическими параметрами, как среднее время удерживания препарата в организме, которое почти в 2 раза выше для ГБ-115 после введения микронизированной субстанции 39,87 мин, чем после введения кристаллической — 23,83 мин. Соответственно, это нашло отражение и для периода полувыведения, значения которого ниже для кристаллической субстанции — 14,73 мин, чем для микронизированной субстанции — 21,49 мин.

Следует отметить, что ГБ-115 более продолжительное время находится в организме испытуемых животных после его введения в виде микронизированной субстанции, чем при введении в той же дозе кристаллической субстанции. На это также указывают полученные значения плазменного клиренса ГБ-115 (4,013 л/мин для микронизированной и 6,099 л/мин для кристаллической субстанции).

Значения гипотетического объёма распределения ГБ-115 после введения анализируемых субстанций отличаются незначительно, что указывает на сходный характер распределения активного вещества в органах и тканях.

Скорость всасывания и площадь под фармакокинетической кривой ГБ-115 существенно отличается после введения крысам 2 субстанций. Так, площадь под фармакокинетической кривой ГБ-115 после введения микронизированной субстанции в 1,5 раза больше, чем после введения кристаллической, что свидетельствует о более высокой относительной биодоступности ГБ-115 после введения микронизированной субстанции (на 42,48 %). Однако скорость всасывания ГБ-115 после введения микронизированной субстанции, судя по времени достижения C_{max} и параметру C_{max}/AUC , происходит медленнее, чем при введении кристаллической субстанции, что может рассматриваться как преимущество данного технологического приёма (микронизации) и более продолжительно определяться в плазме крови животных после введения микронизированной субстанции, что может сопровождаться более продолжительным фармакологическим действием вещества.

Фармакологические исследования

Изучено влияние ГБ-115 в виде кристаллической и микронизированной субстанций в дозах 0,3 и 0,7 мг/кг на поведение беспородных белых крыс в стандартном тесте для оценки тревожности ПКЛ через 30 и 45 мин после введения внутрь.

При анализе зависимости “доза — эффект” показано, что соединение ГБ-115 через 30 мин после введения в виде кристаллической субстанции проявляет статистически значимую анксиолитическую активность только в дозе 0,3 мг/кг, увеличивая время пребывания животных ($p < 0,01$) в открытых рукавах лабиринта. При анализе зависимости “время — эффект”

установлено, что в эффективной дозе 0,3 мг/кг противотревожная активность ГБ-115 значительно снижается через 45 мин после введения, хотя в дозе 0,7 мг/кг наблюдается статистически незначимое увеличение времени пребывания животных в открытых рукавах ПКЛ (рис. 2). Следует отметить, что общая двигательная активность животных, оцениваемая по количеству выходов в открытые и закрытые рукава лабиринта, не изменялась при введении ГБ-115 во всех изученных дозах, что свидетельствует об отсутствии стимулирующего компонента в спектре фармакологической активности дипептида.

При изучении противотревожной активности ГБ-115 в дозах 0,3 и 0,7 мг/кг показано, что дипептид в виде микронизированной субстанции в дозе 0,3 мг/кг через 30 мин после введения внутрь увеличивает время пребывания в открытых рукавах лабиринта ($p < 0,01$), не влияя на число заходов в закрытые рукава лабиринта, что свидетельствует о снижении уровня тревожности животных (рис. 2). В отличие от кристаллической субстанции, анксиолитическая активность ГБ-115 в виде микронизированной субстанции сохранялась через 45 мин после введения ($p < 0,05$), что свидетельствует о более высокой биодоступности микронизированной субстанции ГБ-115 и согласуется с данными по фармакокинетике.

Результаты проведенных исследований показали, что микронизированная субстанция ГБ-115 после перорального введения проявляет более выраженную анксиолитическую активность по сравнению с кристаллической (через 30 мин — на 6 % через 45 мин — на 163 %). При сопоставлении полученных данных по фармакокинетике и фармакологической активности нового соединения дипептидной структуры ГБ-115 показано, что его микронизированная субстанция превосходит по анксиолитическому действию кристаллическую субстанцию ГБ-115 и с позиций фармакокинетики имеет преимущество перед кристаллической субстанцией, так как обладает более высокой биодоступностью.

Таким образом, на основании сопоставления экспериментальных фармакокинетических и фармакодинамических данных ГБ-115 при введении в разных вариантах измельчения субстанции можно рекомендовать при разработке лекарственной формы использование микронизированной субстанции ГБ-115, обладающей лучшими характеристиками как с точки зрения фармакокинетики, так и основного фармакологического действия.

ВЫВОДЫ

1. Относительная биодоступность микрокристаллической субстанции ГБ-115 при пероральном введении увеличивается на 42,48 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с кристаллической субстанцией.

2. ГБ-115 (0,3 мг/кг) после перорального введения в виде микронизированной субстанции вызывает более

продолжительное анксиолитическое действие у крыс по сравнению с кристаллической субстанцией (на 50 %, $p \leq 0,05$).

3. Биодоступность соединения ГБ-115 у крыс является детерминирующим фармакокинетическим параметром в проявлении выраженности анксиолитического действия ГБ-115.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Агафонов, В. К. Пиотровский, *Хим.-фарм. журн.*, **25**(10), 16 – 19 (1991).
2. Т. А. Гудашева, В. П. Лезина, Е. П. Кирьянова др., *Биоорг. химия*, **39**(3), 293 – 302 (2013).
3. В. П. Жердев, А. А. Литвин, *Клин. фармакокинет.*, № 2, 1 – 3 (2005).
4. Е. В. Иванникова, В. П. Жердев, С. С. Бойко и др., *Фармакокинет. и фармакодинам.*, № 2, 1 – 17 (2013).
5. Л. Г. Колик, М. А. Константинопольский, И. В. Рыбина и др., *Бюл. эксперим. Биол. и мед.*, **155**(2), 163 – 166 (2013).
6. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Ч. 1, А. Н. Миронов (ред.), Москва (2012).
7. К. Г. Турчинская, *Автореф. канд. фарм. наук*, Москва (2015).
8. J. Cang, J. Zhang, C. Wang, et al., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**(5), 500 – 507 (2010).
9. D. Jappar, S. P. Wu, Y. Hu and D. E. Smith, *Drug. Metab. Dispos.*, **38**(10), 1740 – 1746 (2010).
10. S. Pellow and S. File, *J. Neurosci. Methods*, **14**(3), 149 – 167 (1985).

Поступила 14.07.15

EXPERIMENTAL PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF GB-115 DIPEPTIDE ANXIOLYTIC SUBSTANCES

L. G. Kolik, V. P. Zherdev, S. S. Boiko, M. A. Konstantinopol'skii, S. Yu. Raskin, T. A. Gudasheva, V. A. Mart'yanov, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

Pharmacokinetics and pharmacological activity of GB-115 dipeptide anxiolytic after oral administration in the form of crystalline and micronized substances was studied in albino male rats. In contrast to crystalline, the micronized substance exhibited better pharmacokinetic parameters and higher bioavailability. In the "elevated plus maze" test, GB-115 in micronized form at a dose 0.3 mg/kg demonstrated pronounced anxiolytic properties during prolonged period as compared to crystalline substance at the same dose. The obtained data allow the micronized substance of GB-115 to be recommended for inclusion in pharmaceutical composition of new dipeptide anxiolytic drug formulations.

Keywords: pharmacokinetics; GB-115 dipeptide; crystalline substance; micronized substance; anxiolytic; rats.