

ИССЛЕДОВАНИЯ ОРГАННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ЭКСКРЕЦИИ СУБСТАНЦИИ РАПИТАЛАМА

¹Авдеева Н.В., ¹Покровский М.В., ¹Куликов А.Л.

¹ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, e-mail: 7400468@mail.ru

На базе центра доклинических исследований Белгородского государственного национального исследовательского университета проведено изучение органного распределения и экскреции Рапиталама, являющегося модулятором mGluR4 рецепторов. Исследование проводилось на 18 крысах. Концентрацию Рапиталама в биообразцах животных определяли с помощью разработанного ранее метода – высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием, который обладает высокой чувствительностью и селективностью, что позволяет определять низкие концентрации препарата (на уровне нг/мл) в различных биологических матрицах крыс. Рапиталам вводили многократно внутрижелудочно при помощи зонда в дозе 60 мг/кг. Проведенные исследования показывают, что Рапиталам достаточно интенсивно проникает в органы и ткани с большим уровнем гемодинамики. Изучение экскреции препарата показало, что большая часть препарата выводится в неизменном виде с калом.

Ключевые слова: Рапиталам, болезнь Паркинсона, высокоэффективная жидкостная хроматография, метаботропные глутаматные рецепторы, экскреция.

THE STUDY OF ORGAN DISTRIBUTION AND EXCRETION OF THE SUBSTANCE RAPITALAM

¹Avdeeva N.V., ¹Pokrovskiy M.V., ¹Kulikov A.L.

¹Belgorod State National Research University, Belgorod, e-mail: 7400468@mail.ru

The study of organ distribution and excretion of Rapitalam, a modulator of the mGluR4 receptor, was carried out on the basis of the center of preclinical studies, Belgorod National Research University. The study was conducted on 18 rats. The concentration of Rapitalamin bioexponents of animals was found out with the help of the previously worked out method of a highly effective liquid chromatography with tandem masselective detecting. This method has high sensitivity and selectivity which allow to detect the low concentration of the drug (at the level of ng/ml) in various biological matrixes of rats. Rapitalam was repeatedly injected intragastrically with the help of a tube at a dose of 60 mg/kg. The research has shown that Rapitalam quite rapidly penetrates into organs and tissues with a high level of hemocirculation. The study of the excretion of the drug has revealed that the majority of the drug is excreted unchanged in the feces.

Keywords: Rapitalam, Parkinson's disease, high performance liquid chromatography, metabotropic glutamate receptors, excretion.

Болезнь Паркинсона – хроническое нейродегенеративное заболевание, в основе которого лежит прогрессирующее разрушение и гибель нейронов, вырабатывающих нейромедиатор дофамин [11]. Недостаточная выработка дофамина ведет к активирующему влиянию базальных ганглиев на кору головного мозга [5]. Ведущими симптомами являются: мышечная ригидность, гипокинезия, тремор, постуральная неустойчивость. Современная медицина пока не нашла методов излечения данной патологии, однако современные методы консервативного и оперативного лечения позволяют значительно улучшить качество жизни больных и замедлить прогрессирование болезни. Существуют данные о ключевой роли гиперактивации глутаматных рецепторов в патогенезе болезни Паркинсона. Это позволяет предположить, что глутаматные рецепторы могут быть новыми терапевтическими мишенями

при лечении данной патологии [3]. Изучение блокаторов глутаматных рецепторов является важной задачей при поиске новых фармакологических средств для лечения болезни Паркинсона. Исследования, проведенные на животных моделях, позволяют предположить, что изменение активности этих рецепторов может облегчить первичные двигательные симптомы болезни Паркинсона, а также побочные эффекты, вызванные заместительной терапией леводопы. Антагонисты AMPA- NMDA-рецепторов показали возможность реверсировать двигательную симптоматику и леводопа-индуцированные дискинезии в доклинических моделях болезни Паркинсона [10]. Антагонисты метаботропных рецепторов глутамата являются еще более перспективными для лечения болезни Паркинсона благодаря более «точной» работе в синапсе [3]. Эти препараты также реверсируют двигательный дефицит и способствуют торможению нейродегенерации. Таким образом, рецепторы глутамата представляют собой перспективные цели для разработки новых фармакологических методов лечения болезни Паркинсона.

Доклиническое изучение модулятора mGluR4 рецепторов – Рапиталама представляется перспективным для создания на его основе лекарственного средства, обладающего антипаркинсоническим эффектом.

Целью исследования: изучить органное распределение и экскрецию блокатора mGluR4 рецепторов – Рапиталама у крыс.

Материалы и методы исследования

Определение концентрации Рапиталама в биообразцах крыс проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с высокоселективным и чувствительным тандемным масс-спектрометрическим детектированием [7; 8]. Анализ проводился на жидкостном хроматографе Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 RS, оснащенный термостатируемым автоматическим дозатором, вакуумным дегазатором, градиентным насосом, термостатом колонок. Детекцию аналита осуществляли на масс-спектрометре VelosPro (ThermoScientific, США) с ионизацией в нагреваемом электроспрее (H-ESI-II).

Параметры работы аналитической системы

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке размером 150 × 2,1 мм, заполненной обращённо-фазовым сорбентом ZorbaxEclipse XDB C18 с размером частиц 3,0 мкм с защитной колонкой ZorbaxEclipse XDB C18 12,5×3,0 мм с размером частиц 5,0 мкм, при температуре 40 °С в режиме изократического разделения со скоростью потока 0,3 мл/мин. Объем вводимой пробы – 5 мкл. Ориентировочные времена удерживания при указанных условиях: Рапиталама – около 7 мин; внутренний стандарт (фабомотизол) – около 2,1 мин. Время инъекции – 7,0 мин. Ионизацию проводили при помощи H-ESI в режиме «+».

Сканирование осуществляли по селективно выбранным ионам (SIM). Переход масс для Рапиталам.: 383,84→367,0, внутренний стандарт: 244,7→130,94. Напряжение на источнике 3000 V. Температура источника 300 °С. Остальные параметры в соответствии с автоматической оптимизацией прибора.

Крысы – общепринятый вид животных для изучения экскреции и распределения в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [2]. В исследование включено 18 крыс (самцы весом 330-380 г). Источник животных – питомник Белгородского государственного университета. Время адаптации составило не менее 10 дней. Во время этого периода осуществлялся ежедневный осмотр внешнего состояния животных. В исследование были отобраны животные без признаков отклонений внешнего вида, животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы включены не были. Крыс содержали по 6 голов в поликарбонатных клетках. Уход и содержание животных производили в соответствии с нормативами, данными в руководстве Guide for the care and use of laboratory animals. The National Academy press. – Washington D.C., 2011 [6], и правилам, утвержденным ГОСТ 31886-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики» [1].

Выведение исследуемого вещества изучали на 6 крысах-самцах. Рапиталам вводили однократно внутрижелудочно при помощи зонда в дозе 60 мг/кг в виде 60 мг/мл суспензии в воде. Для забора мочи и кала использовали метаболические клетки (Techniplast, Италия). Исследовали экскрецию препарата с мочой и калом в интервалах времени: 0-4, 4-8, 8-24 ч.

Органное распределение вещества изучали на 12 крысах-самцах после однократного внутрижелудочного введения Рапиталама животным в дозе 60 мг/кг. Были собраны цельная кровь, плазма, тимус, печень, головной мозг, почки, сердце, легкие, кровь, кишечник, селезенка, кожа, мышцы, жировая ткань.

Пробоподготовка: анализируемый орган и кал за отчетный период взвешивали, помещали в контейнер, прибавляли аликвоту воды в количестве эквивалентном массе, замораживали при -70 °С и в твёрдом агрегатном состоянии гомогенизировали. Мочу использовали без предварительной обработки. Далее проводили извлечение определяемого вещества в жидкую фазу гомогената путём обработки ультразвуком в течение 30 минут (финальный гомогенат). 200 мкл финального гомогената или мочи переносили в пробирку типа «эппендорф» вместимостью 1,5 мл, добавляли 50 мкл раствора внутреннего стандарта, перемешивали, прибавляли 0,5 мл MeOH, встряхивали на шейкере 15 минут. Далее проводили экстракцию определяемого вещества на ультразвуковой бане в течение 30 минут. Затем пробы центрифугировали при 13 000 об/мин и температуре 4 °С 25–30 минут (для

кала и органов соответственно). Супернатант аккуратно декантировали в виалы для хроматографирования и анализировали.

В качестве плацебо для построения калибровочной кривой и в растворах контроля качества использовали нулевые гомогенаты органов, кала и нулевой мочи крыс. Также нулевые гомогенаты органов, кала и нулевой мочи использовали для подтверждения селективности методики. Для подтверждения достоверности полученных результатов растворы контроля качества анализировали в процессе исследования и находили погрешности между введенным и найденным количеством определяемого вещества и затем сравнивали с допустимыми пределами.

В специализированной программе Xcalibur 2.2 рассчитывали площади пиков анализируемого вещества и внутреннего стандарта, далее данные переносили в пакет Microsoft Office Excel 2010, где рассчитывали уравнение калибровочной кривой, статистически оценивали отклонения, графически отображали результаты. Концентрации Рапиталама в исследуемых объектах рассчитывали в программе Microsoft Office Excel 2010 по калибровочным кривым.

Выбросы (резко выделяющиеся результаты) у крыс в каждой временной точке выявляли с помощью статистического критерия Граббса [9]. Если для какого-либо образца величина Z была больше критического значения для данного числа измерений N , этот образец исключали из дальнейших расчетов изучаемых параметров. Так, для $N=6$ критическое значение Z равно 1,89, поэтому пробы с $Z > 1,89$ считались выбросами [4].

Результаты исследований

Распределение Рапиталама изучали после однократного внутрижелудочного введения крысам в дозе 60 мг/кг. В таблице 1 представлены результаты определения содержания Рапиталама в исследованных органах и тканях. Расчёт кажущегося коэффициента распределения (K_d) между плазмой и тканями представлен в таблице 2.

Таблица 1

Концентрация Рапиталама в органах крыс

№	Концентрация, мкг/г												
	Легкие	Сердце	Кожа	Мышечная ткань	Почки	Печень	Жировая ткань	Тимус	Селе- зёнка	Тонкий кишечник	Мозг	Подже- лудочная железа	Плазма
1	0,042	0,520	0,081	1,732	0,053	9,333	2,062	0,024	0,109	4,328	20,299	0,044	15,956
2	0,039	0,577	0,063	1,778	0,045	7,742	2,579	0,017	0,071	5,062	16,481	0,065	20,458
3	0,038	0,578	0,053	2,064	0,035	8,347	3,035	0,024	0,068	5,231	18,390	0,090	19,605
4	0,047	0,592	0,061	2,078	0,055	7,586	2,057	0,045	0,086	4,656	11,612	0,078	17,867
5	0,035	0,684	0,081	2,025	0,048	11,714	2,786	0,033	0,074	3,860	13,719	0,056	14,713
6	0,023	0,858	0,042	2,547	0,036	11,756	3,202	0,054	0,076	3,210	15,922	0,059	17,905
Среднее	0,037	0,635	0,064	2,038	0,045	9,413	2,620	0,033	0,081	4,391	16,071	0,065	17,751
CV,%	21,6	19,1	24,2	14,3	18,7	20,2	18,4	43,6	18,7	17,4	19,5	25,2	12,1
Медиана	0,039	0,585	0,062	2,045	0,046	8,840	2,682	0,028	0,075	4,492	16,202	0,062	17,886

Таблица 2

Расчёт K_d Рапиталама

№	D – 30 мг/кг												
	Легкие	Сердце	Кожа	Мышечная ткань	Почки	Печень	Жировая ткань	Тимус	Селе- зёнка	Тонкий кишечник	Мозг	Подже- лудочная железа	
1	0,003	0,033	0,005	0,109	0,003	0,585	0,129	0,001	0,007	0,271	1,272	0,003	
2	0,002	0,028	0,003	0,087	0,002	0,378	0,126	0,001	0,003	0,247	0,806	0,003	
3	0,002	0,029	0,003	0,105	0,002	0,426	0,155	0,001	0,003	0,267	0,938	0,005	
4	0,003	0,033	0,003	0,116	0,003	0,425	0,115	0,003	0,005	0,261	0,650	0,004	
5	0,002	0,046	0,005	0,138	0,003	0,796	0,189	0,002	0,005	0,262	0,932	0,004	
6	0,001	0,048	0,002	0,142	0,002	0,657	0,179	0,003	0,004	0,179	0,889	0,003	
Среднее	0,002	0,036	0,004	0,116	0,003	0,544	0,149	0,002	0,005	0,248	0,915	0,004	
CV,%	24,4	23,8	35,0	18,0	26,7	30,0	20,4	44,7	26,9	13,9	22,5	19,6	
Медиана	0,002	0,033	0,003	0,112	0,003	0,505	0,142	0,002	0,005	0,261	0,911	0,004	

Как видно из приведенных результатов, препарат хорошо распределяется в органы. Наибольшее содержание наблюдалось в тканях мозга, печени, тонкого кишечника, жировой ткани, мышцах и сердце. Наименьшее содержание наблюдалось в легких, коже, почках, тимусе, селезенке, поджелудочной железе.

Экскрецию Рапиталама изучали после однократного внутрижелудочного введения препарата крысам в дозе 60 мг/кг. В таблице 3 представлен расчёт общего клиренса. В таблице 4 представлены результаты по выведению Рапиталама из организма крыс. Определено общее содержание препарата в моче и кале крыс.

Таблица 3

Содержание Рапиталама в моче крыс и почечный клиренс при однократном внутрижелудочном введении в дозе 60 мг/кг

№ животного	Время, ч				Общее кол-во (0-24 ч), мкг	Процент от дозы, %*кг	AUC, мин*мкг/мл	Cl _{renal} , мл/мин
	0-4	4-8	8-24	24-48				
1	0,206	0,643	166,450	269,988	437,287	2,429	3459,744	0,126
2	0,508	0,742	154,76	258,760	260,010	1,445	3234,632	0,080
3	0,364	0,735	187,489	260,432	448,285	2,490	3032,789	0,148
4	0,444	0,688	145,567	279,567	426,266	2,368	3677,985	0,116
5	0,436	0,701	188,986	278,455	468,578	2,603	3544,748	0,132
6	0,548	0,598	169,754	288,340	459,240	2,551	3654,432	0,126
Среднее	0,418	0,674	171,649	272,590	416,611	2,315	3434,055	0,121
SD	0,071	0,055	17,765	11,636	78,176	0,434	253,679	0,023
CV, %	15	8	10	4	19	19	7	19
Медиана	0,444	0,688	169,754	274,221	442,683	2,459	3502,246	0,126

Таблица 4

Содержание Рапиталама в кале крыс при однократном внутрижелудочном введении в дозе 60 мг/кг

№ животного	Время, ч				Общее кол-во (0-24 ч), мкг	Процент от дозы, %*кг
	0-4	4-8	8-24	24-48		
1	980,000	1368,432	4325,789	8456,351	15130,572	84,059
2	780,569	1445,876	4656,845	8234,544	15117,834	83,988
3	660,675	1345,434	4634,845	7978,542	14619,496	81,219

4	880,323	1034,564	4345,243	8654,341	14914,471	82,858
5	960,564	1546,339	4645,376	8389,450	15541,729	86,343
6	1530,432	1387,447	4045,987	8098,432	15062,298	83,679
Среднее	965,427	1354,682	4442,348	8301,943	15064,400	83,691
SD	301,249	172,553	246,739	247,480	301,828	1,677
CV, %	31	13	6	3	2	2
Медиана	920,444	1377,940	4490,044	8311,997	15090,066	83,834

Исследуемое вещество в неизменном виде обнаруживается в моче в низких концентрациях (2,3% от дозы). Таким образом, для Рапиталама почечный клиренс слабо выражен. С калом препарат выводится преимущественно в промежутке времени 8-24 часа. Общее количество Рапиталама в фекалиях, собранных за 24 ч, составляет около 83,7% от введенной дозы. Принимая во внимание полученные результаты, очевидно, что большая часть препарата выводится в неизменном виде.

Выводы

1. Рапиталам достаточно интенсивно проникает в органы и ткани с большим уровнем гемоциркуляции. Наибольшее содержание характерно для мозга, печени, тонкого кишечника, жировой ткани, мышц и сердца. Распределения препарата в легких, коже, почках, тимусе, селезенке и поджелудочной железе близки между собой.

2. Изучение экскреции препарата показало, что в неизменном виде в моче обнаруживается низкий уровень Рапиталама, 2,3% от общей дозы. С калом препарат выводится преимущественно в промежутке времени 8-24 часа после введения в количестве 83,7% от общей дозы. Принимая во внимание данные результаты, очевидно, что большая часть препарата выводится в неизменном виде. Это является положительным фактором, поскольку биотрансформация вещества может привести к сокращению его действия.

Список литературы

1. ГОСТ 31886-2012. Принципы надлежащей лабораторной практики. – М. : Стандартиформ, 2013. – С. 3-7.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: часть первая / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян и др. - М. : Гриф и К, 2012. – С. 15-16.
3. Avdeeva N.V., Nikitina V.A., Kochkarova I.S., Litvinova A.S. The possibility of administration of glutamate receptors antagonists in the treatment of parkinson's disease // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. - 2016. - Vol. 2. - № 3. - P. 86-94.

4. Bland M. An introduction to medical statistics. - 3rd edition. - Oxford Medical Publications, 2000. - P. 422.
5. Delong M.R., Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia // Arch Neurol. - 2007. - № 64 (1). - P. 20-24.
6. Guide for the care and use of laboratory animals. – Washington D.C. : National Academy press. – URL: <http://www.cpp.edu/~research/acuc/doc/guide%20to%20use%20lab%20animals.pdf>.
7. Guideline on bioanalytical method validation (European medicines agency). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). - London, July, 2011.
8. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U. S. Government Printing Office, Washington, DC (2001).
9. Grubb's Test for Detecting Outliers. – URL: <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>.
10. Kari A. Johnson, P. Jeffrey Conn, Collen M. Niswender Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease // CNS Neurol Disord Drug Targets. - 2009. - № 8 (6). - P. 475-491.
11. Obeso J.A., Rodríguez-Oroz M.C., Benitez-Temino B. et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease // Mov. Disord. 23. - 2008. - № 3. - P. 548–59.