

Изучение фармакокинетики кагоцела с применением тритиевой метки

А.А. Андреев-Андриевский^{1, 2, 3}, А.С. Попова¹, Е.А. Лагерева^{1, 2},
М.А. Машкин^{1, 2}, Б.А. Рудой⁴, Ю.Г. Казаишвили⁵, В.С. Щербакова⁵

¹Научно-исследовательский институт Митоинженерии МГУ;

Российская Федерация, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 75-а, пом. II, ком. 17.

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет;

Российская Федерация, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

³Институт медико-биологических проблем РАН;

Российская Федерация, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, д.76А, стр.34.

⁴ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»; Российская Федерация, 125252,

Москва, ул. авиаконструктора Микояна, д.12. Офисный комплекс «Линкор», корп.А.

⁵ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА»;

Российская Федерация, Калужская обл., 249030, Обнинск, ул.Королева, д.4, оф.402

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Андреев-Андриевский Александр Александрович – старший научный сотрудник биологического факультета МГУ, руководитель отдела исследований на животных ИЦ ВЭК ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», старший научный сотрудник ГНЦ РФ – ИМБП РАН, кандидат биологических наук. Тел.: +7 (495) 930 10 67. E-mail: aaa@mitotech.ru. <https://orcid.org/0000-0002-1173-8153>

Попова Анфиса Сергеевна – научный сотрудник отдела исследований на животных ИЦ ВЭК ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», научный сотрудник ГНЦ РФ – ИМБП РАН, кандидат биологических наук. Тел.: +7 (495) 930 10 67. E-mail: popova.anfisa@gmail.com.

Лагерева Евгения Александровна – научный сотрудник отдела исследований на животных ИЦ ВЭК ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», младший научный сотрудник ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Тел.: +7 (495) 930 10 67. E-mail: e.lagereva@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-6701-0487>

Машкин Михаил Александрович – научный сотрудник отдела исследований на животных ИЦ ВЭК ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», студент биологического факультета МГУ. Тел.: +7 (495) 930 10 67. E-mail: madray04@gmail.com.

Рудой Борис Анатольевич – руководитель отдела фармацевтических разработок ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», доктор биологических наук, профессор. Тел.: +7 (495) 741-49-89 (доб. 1243) E-mail: Boris.Rudoy@nearmedic.ru (корреспондирующий автор). <https://orcid.org/0000-0003-4421-1777>

Казаишвили Юрий Георгиевич – ведущий биолог сектора доклинических исследований ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА», кандидат биологических наук Тел.: +7 (495) 741-49-89 (доб. 3902) E-mail: Yuriy.Kazaishvili@nearmedic.ru

Щербакова Виктория Сергеевна – руководитель сектора доклинических исследований ООО «НИАРМЕДИК ФАРМА», кандидат биологических наук Тел.: +7 (495) 741-49-89 (доб. 3902) E-mail: Viktoriya.Shcherbakova@nearmedic.ru. <https://orcid.org/0000-0002-2483-6238>

РЕЗЮМЕ

Введение. Фармацевтическая субстанция кагоцел является действующим веществом одноименного лекарственного препарата, применяемого для лечения вирусных инфекций. Для исследования фармакокинетики этого высокополимерного соединения в экспериментах на животных наиболее приемлем метод с использованием радиоактивной тритиевой метки.

Цель работы – отработка биоаналитической методики выявления кагоцела в организме животных и определение основных особенностей фармакокинетики этого полимерного вещества.

Материал и методы. Фармакокинетические исследования проводились с использованием меченой тритием субстанции кагоцел на крысах линии Wistar. В работе оценивали количественное содержание кагоцела в крови, тканях и экскретах.

Результаты. Экспериментально подтверждена возможность изучения фармакокинетики кагоцела с использованием растворов меченой тритием субстанции. Определены основные фармакокинетические параметры, с помощью которых установили, что кагоцел – типичное полимерное вещество с относительно невысокой (13–15%) абсолютной биодоступностью при пероральном введении. Кагоцел характеризуется длительным (около 2 сут) периодом полувыведения из организма без существенной кумуляции в органах и тканях. Установлены некоторые методические особенности использования меченых тритием препаратов модифицированных полисахаридов, которые должны учитываться при валидации биоаналитических методик, предназначенных для контроля распределения и выведения подобных продуктов.

Заключение. Используемые в данной работе методические подходы позволяют количественно определять содержание меченого тритием кагоцела в биологических матрицах. Для уточнения ряда параметров, более полно характеризующих процессы ADME полимера кагоцел, необходимы дополнительные исследования.

Ключевые слова: кагоцел, полимер, фармакокинетика, тритий, метка.

Для цитирования: Андреев-Андреевский А.А., Попова А.С., Лагерева Е.А., Машкин М.А., Рудой Б.А., Казаишвили Ю.Г., Щербаклова В.С. Изучение фармакокинетики кагоцела с применением тритиевой метки. Фармация, 2019; 69 (8): 44–51. <https://doi.org/10/29296/25419218-2019-08-08>

STUDY OF PHARMACOKINETICS OF TRITIUM-LABELED KAGOCEL

A.A. Andreev-Andrievsky, PhD^{1,2,3}; A.S. Popova, PhD¹; E.A. Lagereva^{1,2}; M.A. Mashkin^{1,2}; Professor B.A. Rudoy, PhD⁴; Yu.G. Kazaishvili, PhD⁵; V.S. Shchervbakova, PhD⁵

¹LLC «Research Institute of Mitoengineering, Moscow State University»; ²Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University;

³State Research Center of the Russian Federation – Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow;

⁴LLC «Nearmedic Plus», Moscow; ⁵LLC «Nearmedik Pharma», Moscow

INFORMATION ABOUT OF THE AUTHORS

Alexander A. Andreev-Andrievskiy – Senior Researcher of the Department of Biology of Moscow State University, Head of Animal Research Department, «Research Institute of Mitotechnology of Moscow State University», Senior Researcher Institute for biomedical problems RAS. Ph.D. Tel.: +7 (495) 930 10 67. E-mail: aaa@mitotech.ru. <https://orcid.org/0000-0002-1173-8153>

Anfisa A. Popova – Senior Researcher of Animal Research Department, «Research Institute of Mitotechnology of Moscow State University», Senior Researcher Institute for biomedical problems RAS. Ph.D. Tel.: +7 (495) 930 10 67. E-mail: popova.anfisa@gmail.com.

Evgenia A. Lagereva – Senior Researcher of Animal Research Department, «Research Institute of Mitotechnology of Moscow State University», Jr. Researcher Institute for biomedical problems RAS. Tel.: +7 (495) 930 10 67, E-mail: e.lagereva@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-6701-0487>

Mikhail A. Mashkin – Jr. Researcher of Animal Research Department, «Research Institute of Mitotechnology of Moscow State University» Tel.: +7 (495) 930 10 67. E-mail: madray04@gmail.com.

Boris A. Rudoy – Head of Department of Pharmaceutical Development, D.Sc., professor. Tel.: +7(495) 741 49 89. E-mail: Boris.Rudoy@nearmedic.ru. <https://orcid.org/0000-0003-4421-1777>

Yuriy G. Kazaishvili – Senior biologist of the Department of Preclinical Studies, Ph.D., Tel.: +7 (495) 741-49-89 E-mail: Yuriy.Kazaishvili@nearmedic.ru

Viktoriya. S. Shchervbakova – head of the Department of Preclinical Studies, Ph.D., Tel.: +7 (495) 741-49-89 E-mail: Viktoriya.Shchervbakova@nearmedic.ru. <https://orcid.org/0000-0002-2483-6238>

SUMMARY

Introduction. The pharmaceutical substance Kagocel is the active substance of the drug of the same name, which is used to treat viral infections. The method using tritium as a radioactive label is most appropriate to study the pharmacokinetics of this high-polymer compound in animal experiments.

Objective: to perfect a bioanalytical procedure for detecting kagocel in animals and determining the main features of the pharmacokinetics of this polymer substance.

Material and methods. Pharmacokinetic studies were conducted using the tritium-labeled Kagocel substance in Wistar rats. The investigation quantified the level of kagocel in the blood, tissues, and excreta of the animals.

Results. The possibility of studying the pharmacokinetics of kagocel, by using the solutions of tritium-labelled substance was experimentally confirmed. The investigators determined the main pharmacokinetic parameters that were used to establish that kagocel is the typical polymer substance with a relatively low (13–15%) absolute bioavailability when administered orally. Kagocel was characterized by its long (about 2-day) half-life and without substantial accumulation in organs and tissues. The investigators also established some methodological features of using tritium-labeled modified polysaccharides, which should be taken into account when validating the bioanalytical procedures for controlling the distribution and excretion of such products.

Conclusion. The methodological approaches applied in this investigation allow quantification of the level of tritium-labeled kagocel in biological matrices. Additional studies are needed to clarify a number of parameters that more fully characterize the ADME processes of the polymer kagocel.

Key words: kagocel, polymer, pharmacokinetics, tritium, label.

For citation: Andreev-Andrievsky A.A., Popova A.S., Lagereva E.A.; Mashkin M.A.; Rudoy B.A., Kazaishvili Yu.G., Shchervbakova V.S. Study of Pharmacokinetics of tritium-labeled Kagocel. Farmatsiya (Pharmacy), 2019; 69 (8): 44–51. <https://doi.org/10/29296/25419218-2019-08-08>

Введение

Полимер кагоцел является действующим веществом одноименного лекарственного препарата «Кагоцел®», применяемого для лечения острых респираторных вирусных инфекций и герпеса [1]

По химическому строению кагоцел – это высокомолекулярное соединение, физиологически активный полимер «прививочного типа» на основе окисленной карбоксиметилцеллюлозы и связанными с ней модифицированными молекулами госсипола [2].

Подобно многим другим производным целлюлозы, кагоцел содержит очень небольшое количество (менее 1% по массе) связанных молекул полифенола, не обладает какими-либо специфическими физико-

химическими свойствами, по которым можно было бы идентифицировать и количественно определить его в условиях анализа сложных по составу биологических жидкостей.

Поэтому для исследования фармакокинетики кагоцела наиболее приемлем метод включения в его молекулы атомарной или молекулярной метки. При этом важно, чтобы включаемая метка обладала высокой индикативностью, обеспечивая возможность количественного определения меченого вещества в минимальных концентрациях. В то же время, такая метка не должна изменять фармакокинетические особенности меченого полимера. С учетом высокой сложности реализации способа включения в кагоцел

достаточных количеств стабильной, ковалентно связанной радиоактивной метки (например, изотопа ^{14}C) для проведения фармакокинетических исследований кагоцела нами был выбран подход с введением в полимер радиоактивных атомов трития. По данным литературы, применение трития для этих целей имеет ряд существенных особенностей, специфичных для выбранного типа подлежащих пометке молекул и вида животных, с использованием которых проводится исследование фармакокинетики [3, 4]. Наиболее существенная особенность – зависимость процесса включения и спонтанного обмена атомов трития от конформации полимерных молекул, а также наличие в препаратах меченых органических соединений атомов трития, в различной степени подверженных обмену с растворителями и окружающими веществами в сложных молекулярных системах, которые обычно обозначают терминами «необмениваемая метка», «обмениваемая метка», «свободная метка» [4–5].

Методики получения пригодных для фармакокинетических исследований меченных тритием препаратов полимера кагоцел были разработаны нами ранее [9, 10]. В настоящей работе был использован препарат, полученный методом термической активации трития [10].

Цель работы – обработка биоаналитической методики выявления меченного тритием кагоцела в организме животных и определение основных особенностей фармакокинетики этого полимерного вещества.

Материал и методы

В экспериментах использовали меченную тритием субстанцию кагоцел (кагоцел- ^3H) с радиохимической чистотой 95–97% и удельной активностью 0,1 мКи/мг. Радиохимическая чистота препарата кагоцел- ^3H была подтверждена методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), эксклюзионной хроматографии, длительного диализа в водных растворах, а также количественного определения остаточной радиоактивности в сухом остатке после высушивания. Стабильность сохранения метки в молекулах вещества подтверждена в условиях его продолжительного (не менее 30 дней) хранения при комнатной температуре в сухом виде, а также при хранении в виде водного раствора в течение 7 суток. За 1 сутки до введения исследуемого препарата животным радиохимическая чистота контролировалась по сухому остатку и составила 97,5%.

При проведении фармакокинетических исследований меченная тритием субстанция кагоцел- ^3H служила трассером. Для получения рабочих растворов субстанции к меченому полимеру добавляли немеченую субстанцию до необходимой конечной удель-

ной активности. Для введения животным применяли препарат меченного трассером вещества с концентрацией 3 мг/мл и удельной активностью 50 мКи/мл.

В эксперименте на крысах исследовали фармакокинетику кагоцела в крови и экскрецию вещества с мочой и калом при однократном внутривенном и внутрижелудочном введении. Для этого животным с предварительно вживленными в бедренную вену катетерами и адаптированными к содержанию в метаболических камерах (по 7 особей для каждого пути введения) однократно вводили меченую субстанцию кагоцела внутривенно или внутрижелудочно в дозе 6 мг/кг (100 мКи/кг). Введение проводили натощак, после 8-часового ограничения доступа животных к пище; корм выдавали через 4 ч после введения препарата. Доступ к воде не ограничивали. Через 1, 5, 15, 30 мин, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 и 192 ч после введения отбирали пробы крови из катетеров, солюбилизировали их с применением жидкости Soluene-350 (Perkin-Elmer, США) и сохраняли при температуре -20 – 25°C до проведения измерений. Пробы мочи и кала крыс собирали за интервалы времени 0–2, 2–4, 4–6, 6–8, 8–12, 12–24, 24–48, 48–72, 72–96, 96–120 ч после введения вещества при помощи метаболических камер, замораживали и сохраняли при температуре -18 – 20°C . При подготовке к исследованию образцов кала часто рекомендуемый для этой цели метод кислотного гидролиза образцов [10] оказался не пригоден, поскольку приводил к появлению высокой фоновой хемиллюминесценции. Поэтому такие пробы также солюбилизировали с применением Soluene-350.

Анализ содержания трития в образцах проводили радиометрическим методом жидкостного сцинтилляционного счета. Перед анализом образцы замораживали, просветляли путем смешивания с 30% перекисью водорода и инкубирования при температуре 50°C в течение 2 ч. Затем к пробам добавляли 10 мл сцинтилляционной смеси UltimaGold (Perkin Elmers, США) и отстаивали в защищенном от света месте в течение не менее 2–4 ч для устранения фоновой хемиллюминесценции.

Экскрецию кагоцела с желчью исследовали после однократного внутрижелудочного введения меченого препарата. Сбор желчи осуществляли у свободноподвижных животных через предварительно вживленные в общий желчный проток катетеры за интервалы 0–20, 20–40, 40–60, 60–90, 90–120 мин, 2–3, 3–4, 4–6, 6–8, 8–10, 10–12, 12–24, 24–36, 36–48, 48–72, 72–96, 96–120 ч. Потери желчных кислот восполняли инфузией раствора очищенной желчи крупного рогатого скота через вживленный в двенадцатиперстную кишку катетер. Собранные образцы замораживали и сохраняли при температуре -18 – 20°C . Анализ концентрации препара-

та кагоцел-³H в образцах выполняли радиометрически методом жидкостного сцинтилляционного счета.

Результаты оценки фармакокинетики тритиевой воды (НТО) использовали для внесения поправок в параметры фармакокинетики кагоцела-³H. Для этого животным с вживленными венозными катетерами (по 3 особи для каждого пути введения) однократно вводили по 0,2 мл/кг (1 мкКи/кг) тритиевой воды. Введение осуществляли натощак после 8-часового ограничения доступа к пище; корм выдавали через 4 ч после введения вещества. Доступ к воде не ограничивали. Пробы крови отбирали из катетеров через 1, 5, 15, 30 мин, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 ч после введения НТО. Собранные образцы крови солиобилизовали и сохраняли при температуре -18–20°C.

Результаты

Оценка кинетики кагоцела в крови. Результаты анализа суммарной радиоактивности образцов крови крыс, отобранных в течение 96 ч после однократного внутривенного (в/в) или перорального (п/о) введения препарата меченой полимерной субстанции кагоцел в дозе 6 мг/кг представлены на рис. 1 (кривые 1 и 2).

При анализе полученных радиометрических данных необходимо иметь в виду, что одной из особенностей использования препаратов, помеченных атомами трития, является необходимость учета вклада в показатель суммарной активности доли так называемой обмениваемой метки [3]. Даже при использовании препаратов меченых субстанций с высокой радиохимической чистотой и минимальным содержанием несвязанного трития, доля такой лабильной метки может увеличиваться в условиях *in vivo* в результате различных физико-химических и биохимических взаимодействий: осмотических и сорбционных процессов, конформационных изменений молекул полимерной субстанции, ее взаимодействия с неорганическими и органическими молекулами в биологических жидкостях. Кроме того, часть тритиевой метки в условиях *in vivo* может представлять собой меченые фрагменты (метаболиты), образующиеся из основного вещества. Однако наи-

больший вклад в этот процесс вносит именно выход некоторого количества обмениваемой метки из молекул меченого полимера в жидкую часть крови, т.е. переход метки в состояние тритиевой воды (НТО). Одним из свидетельств этого явления может являться зарегистрированное в данном эксперименте фактическое совпадение хода кривых, отображающих суммарную активность образцов крови в сроки после 48–60 ч при обоих способах введения препарата (рис. 1).

В связи с этим в независимом эксперименте было дополнительно проведено исследование фармакокинетики свободного трития в форме тритиевой воды (НТО) при таком же введении ее в организм крыс (в/в, п/о). При этом количество вводимой тритиевой воды подбиралось, согласно данным литературы о ее фармакокинетики [11], таким образом, чтобы в отдаленные сроки (после 72–96 ч) после введения активность образцов крови приблизительно соответствовала уровню суммарной активности образцов из основного эксперимента, зарегистрированной при отборе в эти же сроки после введения (рис. 1, кривые 1 и 2).

Результаты эксперимента подтвердили, что после 72 ч ход кривой, отражающей медленное снижение концентрации НТО в крови животных, приближался к ходу кривых 1 и 2 изменения суммарной активности, зарегистрированной после введения меченого полимера. При этом обращают на себя вни-

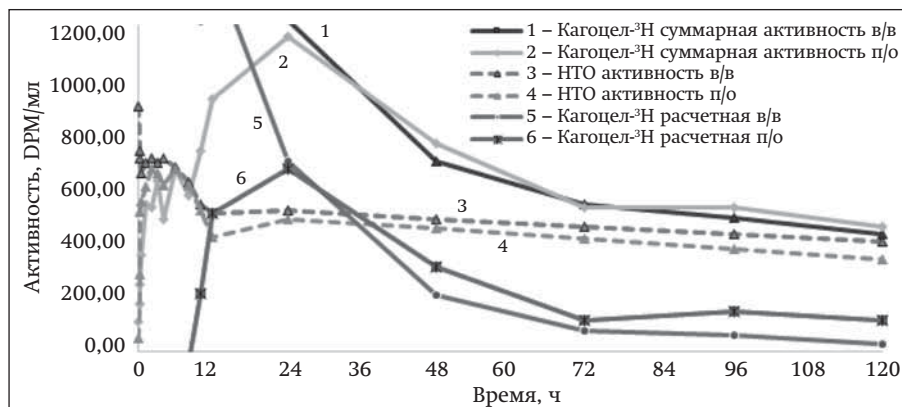


Рис. 1. Фармакокинетика кагоцела в крови крыс после однократного введения 6 мг/кг вещества внутривенно или внутрижелудочно. 1, 2 – суммарная радиоактивность образцов крови после внутривенного и перорального введения препарата меченой субстанции кагоцел в дозе 6 мг/кг соответственно (100 мкКи/кг); 3, 4 – радиоактивность образцов крови после введения животным тритиевой воды внутривенно и внутрижелудочно, в дозе 1 мкКи/кг соответственно; 5, 6 – дифференциальные (разностные) кривые радиоактивности образцов крови после внутривенного и перорального введения препарата меченой субстанции кагоцел с учетом поправки на наличие в препарате обмениваемой (лабильной) метки.

Fig. 1. The pharmacokinetics of kagocel in rat blood after a single intravenous or intragastric injection of 6 mg/kg of the substance: 1, 2 – the total radioactivity of blood samples after intravenous and oral administration of the labeled drug at a dose of 6 mg/kg, respectively (100 μ Ci/kg); 3, 4 – the radioactivity of blood samples after intravenous and intragastric administrations of tritium water to animals at a dose of 1 μ Ci/kg, respectively; 5, 6 – differential (difference) curves of the radioactivity of blood samples after intravenous and oral administrations of the labeled Kagocel with correction for an exchangeable (labile) label contained in the preparation

мавные принципиальные отличия динамики изменения активности, регистрируемой после введения тритиевой воды и образцов меченой субстанции кагоцел в ранние сроки после введения. Так, после кратковременного пикового повышения активности образцов в первые 2–4 ч уже к 12-му часу после введения НТО (как внутривенно, так и перорально) радиоактивность образцов крови значительно снижалась и в дальнейшем практически не уменьшалась, тогда как к этому моменту уровень содержания метки в образцах крови в основном эксперименте с введением меченого кагоцела, наоборот, быстро возрастал.

Полученные в опыте с НТО результаты полностью соответствуют данным литературы об особенностях распределения тритиевой воды в организме, отличающегося относительно равномерным, неизбирательным распределением трития в различных тканях и длительным, до 30–40 сут, выведением радиоактивности из организма [12].

Таким образом, результаты эксперимента с тритиевой водой позволяют предположить, что после введения меченой полимерной субстанции кагоцел некоторая, незначительная (менее 5%) часть включенной в нее тритиевой метки приобретает способность к обмену с жидкой частью плазмы крови, переходя в состояние НТО. В этом состоянии метка очень медленно выводится из организма, создавая «фоновую» радиоактивность образцов.

Вклад «фоновой» метки рассчитывали дифференциальным методом коррекции данных путем совмещения терминальных (после 72 ч) участков фармакокинетических кривых меченого препарата и НТО, в которых углы наклона обеих кривых становились одинаковыми, и последующего вычитания значений активности НТО (рис. 1, кривые 2 и 3) из величины суммарной активности (рис. 1, кривые 1 и 2 соответственно). Результирующие кривые (рис. 1, кривые 5 и 6) фактически описывают фармакокинетику кагоцела после внутривенного и внутрижелудочного введения соответственно.

С помощью этих кривых были определены основные параметры фармакокинетики кагоцела. Вычисленная с учетом удельной радиоактивности образца субстанции максимальная концентрация кагоцела в крови (C_{max}) после однократного внутрижелудочного введения в дозе 6 мг/кг составила 140 ± 40 нг/мл. Время достижения максимальной концентрации вещества (T_{max}) в крови после однократного перорального введения – 24 ч. Время полувыведения кагоцела ($T_{1/2}$) – примерно 48 ч. Вычисленный с использованием скорректированных данных по радиоактивности образцов показатель абсолютной биодоступности кагоцела при пероральном введении его крысам составил 13–15 %

Оценка кинетики выведения кагоцела из организма. Для определения характеристик выведения меченого вещества из организма регистрировали суммарную радиоактивность собранных образцов мочи, желчи и кала. Как показано на рис. 2, экскреция метки с калом после внутривенного введения относительно невелика, максимальных значений достигала к концу 1-х суток и составила суммарно за весь период в среднем 5–6% (рис. 2, а). В то же время наибольшее количество радиоактивной метки, введенной в организм перорально (рис. 2, б), быстро, в течение 1-х суток выводилось именно с калом. После однократного внутрижелудочного введения крысам в экскрементах суммарно было обнаружено около 85–90% от введенной дозы. При этом следует иметь в виду, что суммарная активность метки в экскрементах включает в себя также и часть меченого продукта, выведенного из организма с желчью после всасывания в системный кровоток.

Экскреция метки через печень с желчью (рис. 2, в) после однократного перорального введения субстанции постепенно нарастала в течение 48 ч после введения, достигая максимума на 3-и сутки, после чего в последующие 2 дня наблюдалось постепенное ее снижение. Суммарно за весь период сбора образцов экскреция метки с желчью после введения меченого кагоцела в дозе 6 мг/кг составила около 2–2,5% от введенной в желудок дозы, что при пересчете на количество вещества, поступившего в организм через кишечник, составляет ориентировочно 20%. Полученные данные подтверждают сделанный при анализе фармакокинетических кривых вывод о низкой абсолютной биодоступности полимера кагоцела после перорального введения крысам.

Суммарная экскреция метки с мочой после однократного внутривенного введения составила около 50% от введенной дозы. При этом основное количество препарата выводится в период от 0 до 4 ч (рис. 2, г). После однократного внутрижелудочного введения (рис. 2, д) с мочой за период 0–120 ч суммарно выведено примерно 2,0–2,5% от введенной пероральной дозы, что составляет около 20% от количества вещества, поступившего в организм. Скорость выведения метки достигала максимума через 6–8 ч, а через 24 ч концентрация метки в моче стабилизировалась примерно на одном уровне до окончания периода наблюдения (96–120 ч).

Оценка распределения кагоцела в органах и тканях. Ранее были получены данные о возможности появления в условиях *in vivo*, после перорального введения меченого полимера кагоцела, некоторой доли обменяемой (лабильной) метки в виде НТО. Последняя может вносить вклад в количественное определение

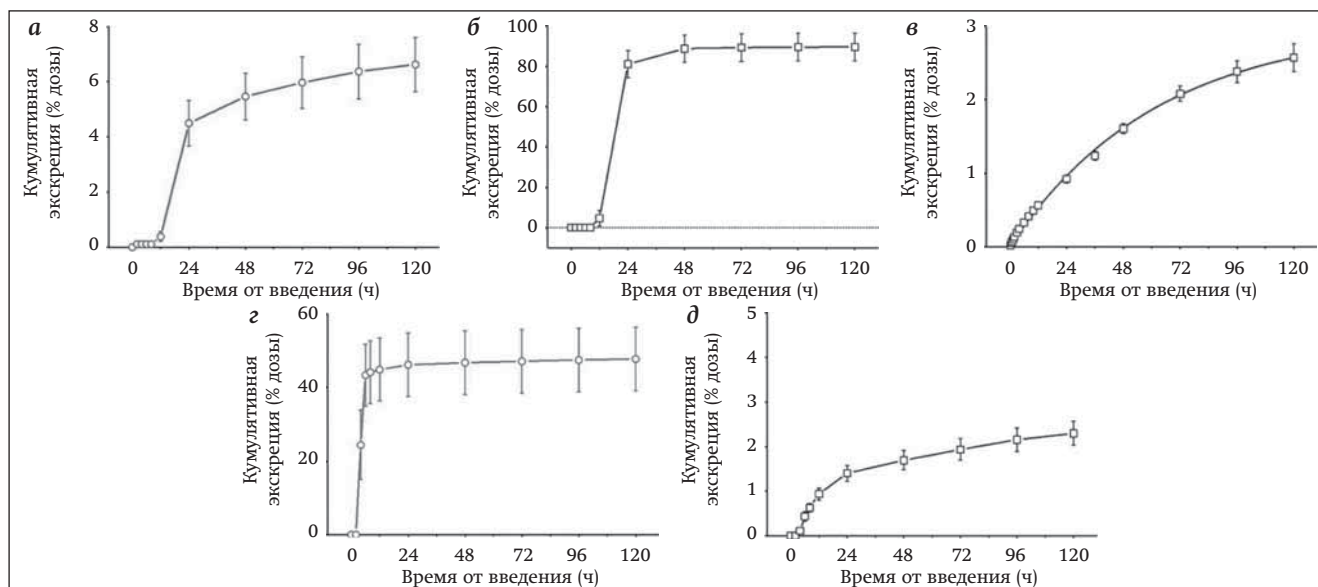


Рис. 2. Кумулятивные кривые экскреции кагоцела-³H (в дозе 6 мг/кг) с калом после внутривенного (а) и внутривенного (б) введения, с желчью после внутривенного (в) и с мочой после внутривенного (г) и внутривенного (д) введения.
Fig. 2. Cumulative excretion curves of ³H-kagocel (at a dose of 6 mg/kg) in feces after intravenous (a) and intragastric (b) administrations, in bile after intragastric administration (c) and in urine after intravenous (d) and intragastric (e) administrations.

меченого соединения. Это следует учитывать при проведении экспериментов по оценке распределения кагоцела в органах и тканях животных. При этом был апробирован такой методический прием удаления лабильной метки из биопрепаратов, как высушивание образцов, которое осуществляли длительно при комнатной температуре. Необходимая для удаления НТО длительность высушивания была определена в модельном эксперименте. Высушиванию подвергали образцы тканей почки, селезенки, головного мозга, семенников. Полученные результаты радиометрического анализа образцов с пересчетом через показатель удельной радиоактивности исходного препарата после однократного введения животным представлены на рис. 3. Концентрация кагоцела вычислена с учетом величины удельной активности введенного препарата меченой субстанции.

Следует отметить, что вычисленные по результатам радиометрической оценки высушенных образцов концентрации кагоцела во всех исследованных органах (за исключением ткани почек и печени) были очень низкими, в пересчете через удельную активность препарата не превышали уровня 80 нг/г и мало изменялись в течение периода наблюдения (до 96–120 ч). Минимальные значения содержания метки зарегистрированы в ткани головного мозга. Показательными при этом являются данные по содержанию радиоактивной метки в почках и печени, через которые преимущественно выводится поступивший в кровоток кагоцел. Наибольшее ее содержание в этих органах регистрируется через 12 ч

после введения препарата, т.е. в период, соответствующий максимальной скорости накопления метки в крови. Затем содержание метки в этих тканях быстро снижалось, и после 24 ч концентрация метки стабилизировалась, но оставалась значительно выше, чем в других органах и тканях. В то же время в крови содержание метки достигало максимальных значений примерно к 20–24 ч после перорального введения (рис. 1).

Согласно данным расчета материального баланса метки, суммарно в органы и ткани после однократного внутривенного введения кагоцела распределяется около 30% от поступившего в системный кровоток количества. При этом после периода быстрой (в течение 24 ч) экскреции основного количества вещества в дальнейшем выведение кагоцела из организма осуществляется замедленно (более 4–5 сут), и его максимальные концентрации в этот период наблюдаются в органах активной экскреции (почки, печень). Так как концентрация вещества в тканях не возрастает во времени, то можно сделать вывод об отсутствии эффекта избирательного накопления (кумуляции) кагоцела в этих тканях.

Обсуждение

Зарегистрированная в ходе эксперимента низкая биодоступность кагоцела, очевидно, обусловлена особенностью процессов всасывания полимерных веществ в кишечнике. Известно, что в любом препарате полимеров распределение отдельных полимерных молекул по размерам, как правило, имеет вид кри-

вой нормального распределения. Способность проникать через эпителиальный барьер в кишечнике снижается по мере увеличения молекулярной массы фрагментов. В частности, молекулы различных синтетических и природных биополимеров размером более 40 кДа практически не могут эффективно преодолевать не только эпителиальный барьер в кишечнике, но и проникать через фильтрационную систему в канальцах почек [11, 13–18]. Кроме того, менее крупные молекулы полимеров в небольших количествах могут попадать в системный кровоток за счет функционирования таких механизмов, как эндоцитоз и перенос через межклеточный матрикс эпителия слизистых [15]. Такие молекулы способны также в незначительной степени преодолевать и фильтрационный барьер в почках [18]. Поэтому можно предполагать, что появление тритиевой метки в крови крыс после внутрижелудочного введения обусловлено главным образом всасыванием в кишечнике с последующей циркуляцией в кровотоке имеющих в суммарном препарате кагоцела молекул с молекулярной массой менее 30–40 кДа. Общее содержание молекул такого размера в препарате, по данным физико-химических исследований субстанции, составляет примерно 20–30% (Патент на изобретение РФ №2499002. Опубл. 14.06.2012). Возможно, с учетом указанных выше ограничений по скорости всасыва-

ния, максимум концентрации кагоцела в крови, зарегистрированный через 24 ч после перорального введения, связан с поступлением в системный кровоток наиболее быстро всасывающейся в кишечнике фракции полимерных молекул размером менее 15–20 кДа.

Выявленные в эксперименте существенные различия в характере экскреции метки с мочой при внутривенном и пероральном способе поступления вещества в организм свидетельствуют о выраженной сорбции полимерных фрагментов кагоцела на таких компонентах крови, как форменные элементы, белки или в иных депо. В этом случае «избыточное» (по отношению к суммарной сорбционной емкости компонентов крови) количество меченого вещества, одномоментно вводимое внутривенно, подвергается достаточно быстрому выведению через почки и печень, в то время как более медленно поступающее в организм при пероральном введении значительно (в 7–10 раз) меньшее количество кагоцела оказывается в крови преимущественно в связанном состоянии, что и обуславливает его малую скорость выведения с мочой и тенденцию к накоплению в почках. Для определения фактического количества сорбированной на компонентах крови меченого вещества необходимо проведение дополнительных экспериментальных исследований.

Существенные различия в сроках достижения максимумов концентрации метки в крови и в тканях почек также могут быть связаны с неравномерностью кинетики всасывания гетерогенного по размерам полимерных молекул вещества кагоцела. Более быстро всасывающиеся в кишечнике молекулы полимера меньших размеров в более короткие сроки поступают в органы экскреции, в то время как эффективность и продолжительность проникновения в кровоток более крупных полимерных молекул существенно ниже, что и определяет «запаздывающий» характер максимального содержания радиоактивной метки в крови. Такие более крупные молекулы полимера значительно медленнее выводятся через почки, что и обуславливает довольно длительный период их повышенного (по сравнению с другими тканями) содержания в этом органе (рис.3).

Результаты экспериментов соответствуют данным об особенностях фармакокинетики кагоцела, полученным ранее на лабораторных мышах. Эти данные послужили основанием для составления раздела инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата «Кагоцел®».

При анализе кинетики выведения радиоактивной метки через органы выделения (почки, печень) также следует иметь в виду, что, помимо молекул самого полимерного вещества и появляющейся *in vivo* обмени-

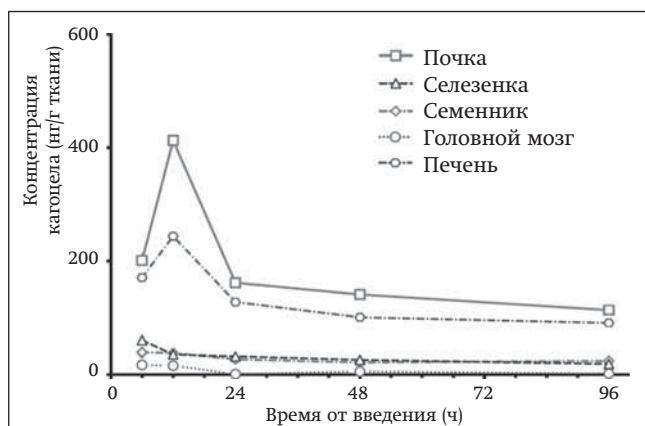


Рис. 3. Содержание кагоцела (нг/г ткани) в органах и тканях крыс после однократного внутрижелудочного введения вещества. Концентрация кагоцела вычислена с учетом величины удельной активности введенного препарата меченой субстанции. Лабильная метка (НТО) из образцов тканей удалена упариванием (значения концентрации кагоцела в печени приведены расчетно с учетом вычисленного по другим тканям поправочного коэффициента на элиминацию свободной метки)

Fig. 3. Kagocel levels (ng/g of tissue) in rat organs and tissues after a single intragastric administration of the substance. The concentration of kagocel was calculated in terms of the value of the specific activity of the administered labeled substance. The labile label from tissue samples was removed by evaporation (the liver concentration of kagocel are given as calculated in terms of the correction factor for elimination of the free label, which was computed for other tissues)

ваемого трития в виде НТО, какая-то доля выводимой метки может представлять собой низкомолекулярные метаболиты основного вещества. Поэтому для определения содержания суммарной доли обмениваемого (в условиях живого организма) трития во введенном меченом препарате может быть использован такой прием, как сопоставление данных по радиоактивности образцов мочи и крови в период установления равновесия распределения метки в системе кровь–моча [5, 6, 19]. Кроме того, следует учитывать, что, согласно имеющимся данным литературы, эффект метаболической нестабильности вводимых молекул в большей степени характерен именно при проведении экспериментов на крысах и может не регистрироваться при исследованиях на более крупных животных с меньшей скоростью метаболизма, например, собаках [3, 19]. Исследование процессов образования метаболитов *in vivo* и выявление их в организме применительно к полимерным лекарственным препаратам представляет собой самостоятельную сложную научную задачу, которая не являлась целью настоящей работы.

Закключение

Экспериментально подтверждена возможность изучения фармакокинетики кагоцела с использованием меченных тритием препаратов субстанции.

Определены основные фармакокинетические параметры, описывающие кагоцел как типичную полимерную субстанцию с относительно невысокой (13–15%) абсолютной биодоступностью при пероральном введении, характеризующуюся длительным (около 2 сут) периодом полувыведения из организма и не имеющую существенной кумуляции в органах и тканях.

Установлены некоторые методические особенности использования меченых тритием препаратов модифицированных полисахаридов, которые должны учитываться при валидации биоаналитических методик, предназначенных для исследования всасывания, распределения и выведения подобных продуктов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Сологуб Т.В., Цветков В.В. Кагоцел в терапии гриппа и острых респираторных вирусных инфекций: анализ и систематизация данных по результатам доклинических и клинических исследований. Терапевтический архив. 2017; 89(8): 113–119. [Sologub T. V. and Tsvetkov V. V. Kagocel in the therapy of influenza and acute respiratory viral infections: data analysis and systematization from the results of preclinical and clinical trials. Terapevticheskii arkhiv, 2017; Vol. 89(8): 113–119. (in Russian)].

2. Кагоцел в педиатрии. К вопросу о репродуктивной безопасности: Сборник статей и материалов. Под общ. ред. чл.-корр. РАН Т.А. Гусковой. Москва: ООО «Издательство «Медицинское информационное агенство», 2018: 112. [Kagocel in pediatrics. On the issue of reproductive safety: collected articles. Ed. by T.A. Guskova. Moscow, 2018. (in Russian)].

3. Lockley W.J.S., McEwen A., Cooke R. Tritium: a coming of age for drug discovery and development ADME studies. Journal of labeled compounds and radiopharmaceuticals, 2012; Vol. 55 (7): 235–257.

4. Atzrodt J., Derdau V., Kerr W.J., Reid M. Deuterium and tritium labelled compounds: applications in the life sciences. Angewandte chemie international edition, 2018; Vol. 57 (7): 1758–1784.

5. Pointurier F., Baglan N., Alanic G., Chiappini, R. Determination of organically bound tritium background level in biological samples from a wide area in the south-west of France. Journal of environmental radioactivity, 2003; Vol. 68 (2): 171–189.

6. Baumgärtner F., Donhaerl W. Non-exchangeable organically bound tritium (OBT): its real nature. Analytical and bioanalytical chemistry, 2004; Vol. 379(2): 204–209.

7. Kim S.B., Baglan N., Davis P.A. Current understanding of organically bound tritium (OBT) in the environment. Journal of environmental radioactivity, 2013; Vol. 126: 83–91.

8. Sang-Bog Kim, Roche J. Empirical insights and considerations for the OBT inter-laboratory comparison of environmental samples. Journal of environmental radioactivity, 2013; Vol. 122: 79–85.

9. Сидоров Г.В., Казаишвили Ю.Г., Рудой Б.А. Синтез полимерной субстанции «Кагоцел», меченной тритием: метод твердофазного каталитического гетерогенного изотопного обмена. Фармация. 2018; 67 (8): 16–21. [Sidorov G.V., Kazaishvili Yu.G., Rudoy B.A. Synthesis of tritium-labelled polymeric Kagocel substance: solid-phase catalytic heterogeneous isotope exchange method. Farmatsiya, 2018; Vol. 67 (8): 16–21. <https://doi.org/10/29296/25419218-2018-08-03> (in Russian)].

10. Бадун Г.А., Чернышева М.Г., Казаишвили Ю.Г., Рудой Б.А. Синтез полимерной субстанции «Кагоцел», меченной тритием: метод термической активации трития. Фармация, 2018; 67 (7): 14–20. [Badun G.A., Chernisheva M.G., Kazaishvili Yu.G., Rudoy B.A. Synthesis of tritium-labelled polymeric kagocel substance: tritium thermal activation method. Farmatsiya, 2018; Vol. 67 (7): 14–20. <https://doi.org/10/29296/25419218-2018-07-03> (in Russian)].

11. Krinsky M., Dagan A., Aptekar L. et al. Assessment of intestinal permeability in rats by permeation of inulin-fluorescein. Journal of basic and clinical physiology and pharmacology, 2000; Vol. 11 (2): 143–154.

12. Takeda H., Kasida Y. Biological behavior of tritium after administration of tritiated water in the rat. Journal of radiation research, 1979; Vol. 20 (2): 174–185.

13. Pantzar N., Westrom B.R., Luts A., Lundin S. Regional small-intestinal permeability in vitro to different-sized dextrans and proteins in the rat. Scand. J. Gastroenterol., 1993; Vol. 28: 205–211.

14. Yuasa H., Kuno C., Watanabe J. Comparative assessment of D-xylose absorption between small intestine and large intestine. The journal of pharmacy and pharmacology, 1997; Vol. 49 (1): 26–29.

15. Han Y., Li X., Chen H., Hu X., Luo Y. et al. Real-time imaging of endocytosis and intracellular trafficking of semiconducting polymer dots. ACS applied materials & interfaces, 2017; Vol. 9 (25): 21200–21208.

16. Giebisch G., Lauson H.D., Pitts R.F. Renal excretion and volume of distribution of various dextrans. American journal of physiology, 1954; Vol. 178(1): 168–176.

17. Hanngren A., Hansson E., Ullberg S., Aberg B. Fate of injected dextran labeled with tritium in mice. Nature, 1959; Vol. 184 (4683): 373–374.

18. Lawrence M.G., Altenburg M.K., Sanford R., et al. Permeation of macromolecules into the renal glomerular basement membrane and capture by the tubules. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017; Vol. 114 (11): 2958–2963.

19. Shaffer C.L., Gunduz M., Thornburgh B.A. et al. Tritiated compound to elucidate its preclinical metabolic and excretory pathways in vivo: exploring tritium exchange risk. Drug metabolism and disposition, 2006; Vol. 34 (9): 1615–1623.

Поступила 13 ноября 2019 г.

Received 13 november 2019

Принята к публикации 20 ноября 2019 г.

Accepted 20 november 2019