

ЯНОВСКАЯ ЕЛЕНА АНАТОЛЬЕВНА

ФАРМАКОКИНЕТИКА 4-МЕТИЛ-2,6-ДИИЗОБОРНИЛФЕНОЛА

(Экспериментальное исследование)

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент РАН
заслуженный деятель науки РФ

Удуг Владимир Васильевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Чернышева Галина Анатольевна

Официальные оппоненты:

Раменская Галина Владиславовна, доктор фармацевтических наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической и токсикологической химии, заведующая кафедрой

Ахмеджанов Рафик Равильевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», кафедра экологии и безопасности жизнедеятельности Института неразрушающего контроля, профессор кафедры.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Защита состоится «___» _____ 2016 года в _____ час на заседании диссертационного совета Д 001.031.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (634028, Томск, пр. Ленина, 3)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (www.pharmso.ru)

Автореферат разослан «___» _____ марта 2016 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор биологических наук

Амосова Евдокия Наумовна

Общая характеристика работы

Актуальность темы

По данным ВОЗ сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают лидирующую позицию среди причин смертности населения: ежегодно от них умирает более 17 млн. человек с прогнозируемым увеличением до 25 млн. человек к 2030 г [World Health Statistics, 2014].

В связи с прогрессирующим развитием сердечно-сосудистых заболеваний во всем мире, исследования, направленные на устранение или снижение влияния основных факторов риска, являются весьма актуальными. Несмотря на то, что основные причины возникновения сердечно-сосудистых заболеваний хорошо известны – атеросклероз коронарных сосудов, тромбоз и тромбоэмболия венечных артерий, спазм сосудов [Окуневич И.В. и др., 2004], за последние десятилетия современное представление о патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний значительно расширилось. Появились новые научные данные о важной роли эндотелия сосудов в общем гемостазе и влиянии свободнорадикальных процессов на его дисфункцию [Шевченко Ю.Л. и др., 2011]. Показано, что эндотелий выполняет антикоагулянтные и вазодилататорные функции стенки сосудов, благодаря синтезу биологически активных веществ (оксида азота, тромбомодулина, тромбоспондина) и активному участию в стабилизации ренин-ангиотензиновой системы [Лупинская З.П., 2003].

При ССЗ возникает эндотелиальная дисфункция, которая сопровождается появлением активных окислительных радикалов, особенно пероксинитратов, способных окислять липиды низкой плотности и оказывать цитотоксическое и иммуногенное действие, а также увеличением выработки ангиотензина II, который в избыточном количестве приводит к окислительному стрессу [Landmesser U. et al., 2006].

Следовательно, эффективная терапия при ССЗ должна включать комбинированный подход с использованием лекарственных препаратов, обладающих органопротекторными, эндотелийпротекторными и

антиоксидантными свойствами. В настоящее время на отечественном рынке недостаточно качественных, эффективных ЛС, используемых в комплексной терапии ССЗ.

В институте химии Коми НЦ УрО РАН из продуктов лесопереработки синтезирован новый полусинтетический антиоксидант 4-метил-2,6-диизоборнилфенол. Доклинические исследования выявили, что вещество улучшает реологические свойства крови при моделировании сердечно-сосудистых заболеваний, обладает нейро- и кардиопротекторным действием [Плотников М.Б., 2009; Плотников М.Б., 2014].

Для создания нового лекарственного средства обязательным этапом является проведение фармакокинетических исследований [Миронов А.Н., 2012], результаты которых позволяют оценить скорость и степень всасывания при разных способах введения, проанализировать пути и механизмы распределения лекарственного средства, спрогнозировать его побочные эффекты, возникающие вследствие депонирования в тканях и органах, а также изучить процессы элиминации из организма. Фармакокинетические исследования позволяют определить основные пути метаболизма, идентифицировать метаболиты и оценить их фармакологическую активность [Сергиенко В.И., 2003].

Степень разработанности

4-Метил-2,6-диизоборнилфенол является новым химическим соединением, синтезированным из продуктов лесопереработки в Институте химии Коми НЦ УрО РАН. В настоящее время, данные о проведении фармакокинетических исследований отсутствуют. Ранее на базе института НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга были проведены фармакологические и токсикологические исследования, в результате которых были выявлены эндотелийпротекторные, церебропротекторные, гемореологические, антитромбоцитарные свойства и низкая токсичность соединения. Исследования 4-метил-2,6-диизоборнилфенола также проводились на базе Института биологии Коми НЦ УрО РАН, в результате которых были обнаружены мембранопротекторные свойства,

обусловленные высокой антиоксидантной активностью и способностью взаимодействовать с мембранами.

Цель исследования

Изучить фармакокинетику 4-метил-2,6-диизоборнилфенола и его биотрансформацию в организме крыс.

Задачи исследования

1. Разработать аналитический метод количественного определения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола и его метаболитов в биологических образцах с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.
2. Изучить фармакокинетику 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в плазме крови крыс после разных способов введения. Оценить влияние лекарственных форм: водно-крахмальной и масляной суспензий на процессы абсорбции после внутрижелудочного, внутримышечного и подкожного введений путем оценки их биодоступности.
3. Изучить фармакокинетику 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в тканях и органах крыс после однократного внутрижелудочного введения взвеси в крахмальной слизи.
4. Изучить экскрецию 4-метил-2,6-диизоборнилфенола и его метаболитов с мочой, калом и желчью.
5. Исследовать метаболизм 4-метил-2,6-диизоборнилфенола.
6. Методом компьютерного моделирования оценить степень связывания 4-метил-2,6-диизоборнилфенола с молекулой альбумина.
7. По результатам проведенных исследований обосновать эффективную лекарственную форму для создания лекарственного средства на основе 4-метил-2,6-диизоборнилфенола.

Научная новизна работы

Разработан и валидирован метод количественного определения на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с флюориметрическим и масс-спектрометрическим детектированием. Впервые была изучена

фармакокинетика нового фенольного антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола при разных способах введения крысам: в водно-крахмальной и масляной суспензиях. Изучена его биотрансформация после внутрижелудочного введения в водно-крахмальной суспензии в дозе 20 мг/кг.

Обнаружено, что 4-метил-2,6-диизоборнилфенол плохо всасывается в ЖКТ и медленно выводится из организма крыс. Результаты исследований тканевого распределения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в организме крыс показали, что 4-метил-2,6-диизоборнилфенол неравномерно распределяется в ткани и органы. Наиболее высокие значения коэффициента тканевого распределения определены для печени и сердца. Обнаружена низкая степень проникновения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в ткани мозга и медленное перераспределение из других органов в почки, в мышечную и жировую ткани. По данным масс-спектрометрического анализа было обнаружено 11 метаболитов, основная доля которых является продуктами конъюгации с аминокислотами.

Теоретическая и практическая значимость работы

В соответствии с программой доклинических исследований, обязательных при разработке новых ЛС, проведено фармакокинетическое изучение нового соединения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола, обладающего эндотелийпротекторной, кардиопротекторной и антиоксидантной активностью и являющегося перспективным для создания нового лекарственного средства.

Полученные результаты фармакокинетических исследований позволили предложить лекарственную форму при разработке лекарственного средства, эффективно подобрать режим дозирования препарата с учетом его избирательного накопления в тканях, органах и скорости выведения из организма, а также определить основные направления по изучению фармакологических свойств нового соединения.

Методология и методы исследования

Объектом исследования является полусинтетическое вещество – 4-метил-2,6-диизоборнилфенол. Предметом изучения являются фармакокинетические

характеристики исследуемого вещества. Основным методом оценки фармакокинетики 4-метил-2,6-диизоборнилфенола являются эксперименты на крысах-самцах Вистар. Основные этапы эксперимента представлены на рисунке 1. Количественное определение 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в биологических образцах проводили с использованием валидированной аналитической методики хроматомасс-спектрометрическим методом. Фармакокинетические параметры оценивали на основе математического моделирования. Статистический анализ данных был проведен в рамках распределения выборки по нормальному закону, оценку которой проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Для статистического описания данных использовали среднее значение и стандартное отклонение. Связывание 4-метил-2,6-диизоборнилфенола с белками оценивали стохастическим методом с использованием программы Autodock 4.2.

Абсорбция, линейность, биодоступность

Внутривенное введение в ДМСО

Внутрижелудочное введение в масляной форме
Вариации доз

Внутрижелудочное введение в крахмальной слизи
Вариации доз

Внутримышечное введение в масляной форме

Подкожное введение в масляной форме

Забор плазмы

Распределение в тканях и органах

Однократное внутрижелудочное введение в крахмальной слизи

Забор печени, сердца, мозга, почек, мышечной ткани, жировой ткани

Элиминация: экскреция и метаболизм

Однократное внутрижелудочное введение в крахмальной слизи

Забор желчи, кала, мочи

Рисунок 1 – Дизайн исследования

Личный вклад автора

Автором самостоятельно разработаны методики количественного определения соединения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в биологических образцах, проведены исследования по изучению процессов всасывания, распределения, экскреции и метаболизма, идентификации метаболитов, обработаны полученные результаты, сформулированы выводы. При

непосредственном участии автора по результатам исследований подготовлены публикации.

Положения, выносимые на защиту

- ✓ Фармакокинетика 4-метил-2,6-диизоборнилфенола характеризуется нелинейной абсорбцией, низкой биодоступностью водно-крахмальной суспензии после внутрижелудочного введения и масляной суспензии после подкожного и внутримышечного способах введения. 4-Метил-2,6-диизоборнилфенол обладает высокой тропностью к тканям печени и сердца и затрудненным прохождением через гематоэнцефалический барьер.
- ✓ Для 4-метил-2,6-диизоборнилфенола характерен активный метаболизм путем окисления пара-метильных групп и конъюгации с аминокислотами. Преимущественный путь элиминации 4-метил-2,6-диизоборнилфенола и его метаболитов через ЖКТ.

Степень разработанности и апробация результатов

Материалы диссертации представлены на первой конференции серии ChemWasteChem: «Химия и полная переработка биомассы леса», (Санкт-Петербург, Репино, 2010), IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), на конференции молодых ученых «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии» (Томск, 2012), XXI международной конференции и дискуссионного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Гурзуф, 2013), первой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013), XXII международной конференции и дискуссионного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Гурзуф, 2014), XXIII международной конференции и дискуссионного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Гурзуф, 2015), восьмой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2015).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией, и 8 тезисов в материалах российских и международных научных конференций.

Структура и объем работы

Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, выводы и список использованной литературы. Работа изложена на 192 страницах машинописного текста, иллюстрирована 51 таблицей и 78 рисунками. Библиография включает 199 источников, из них 152 – зарубежных.

Основное содержание работы

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературы, содержит 78 рисунка, 51 таблицу, 189 стр.

Содержание **Введения** подробно отражено выше.

Первая глава посвящена литературному обзору фармакокинетических и фармакодинамических свойств соединений с химической структурой, схожей с исследуемым соединением 4-метил-2,6-диизоборнилфенолом, и относящихся к группе пространственно-затрудненных фенолов – ионол, бутилгидроксианизол, пробукол, пропофол, фенозан-кислота. Приведены теоретические аспекты физико-химических свойств пространственно-затрудненных фенолов и механизм ингибирующего действия цепных реакций.

Во второй главе описаны материалы и методы, используемые в исследовании. Эксперименты выполнены на крысах-самцах сток Вистар массой 350 ± 50 г. Животные получены в отделе экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. Эксперименты на животных выполнены в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [ETS № 123, 1986].

В качестве исследуемого вещества использовали субстанцию 4-метил-2,6-диизоборнилфенола с содержанием основного вещества не менее 98%, синтезированную на опытном производстве Института химии Коми НЦ УрО РАН (рис. 2).

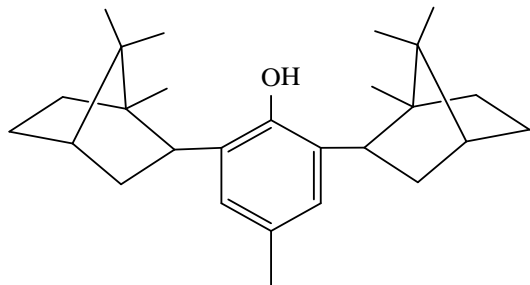


Рисунок 2 – Химическая структура 4-метил-2,6-диизоборнилфенола

В качестве стандартных соединений использовали субстанции с содержанием основного вещества не менее 98%: 3,5-диизоборнил-4-гидроксibenзальдегид, 3,5-иизоборнил-4-гидроксibenзиловый спирт, 3,5-диизоборнил-4-гидроксibenзойную

кислоту, синтезированные на опытном производстве Института химии Коми НЦ УрО РАН.

Вещество вводили крысам внутривенно в бедренную вену в дозе 1,2 мг/кг в виде раствора в диметилсульфоксиде с концентрацией 0,33 мг/мл. Внутрижелудочно вещество вводили в дозах 10, 20, 100 и 200 мг/кг в крахмальной слизи, в дозах 2,5 и 200 мг/кг в миндальном масле, подкожно – в дозе 20 мг/кг в миндальном масле, внутримышечно – в дозе 2,5 мг/кг в миндальном масле.

Количественную оценку 4-метил-2,6-диизоборнилфенола и его метаболитов в биологических образцах проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флюориметрическим и масс-спектрометрическим детекторами на хроматографе «Shimadzu».

Третья глава посвящена описанию полученных результатов.

Приведены результаты валидации аналитической методики в плазме крови крыс: оценка селективности, нижнего предела количественного определения, правильности и прецизионности образцов контроля качества, стабильности при комнатной температуре и долговременном хранении в течение 3 месяцев при -20 °С, а также оценка линейности калибровочной кривой и степени извлечения вещества из биологических материалов (плазмы,

почек, мозга, сердца, печени, мышечной и жировой тканей, желчи, кала, мочи). Результаты оценки всех характеристик, необходимых для проведения валидации методики, удовлетворяют требуемым общим критериям, подтверждающим ее надежность, точность и воспроизводимость.

В главе приведены результаты фармакокинетического моделирования с описанием уравнений двухкамерной (внутривенное введение) и однокамерной (внутрижелудочное, внутримышечное, подкожное введение) моделей.

Оценку абсолютной биодоступности проводили на основании результатов исследования фармакокинетики после внутривенного введения. Динамика концентраций 4-метил-2,6-диизоборнилфенола после внутривенного введения описывается двухкамерной моделью и имеет 2 фазы снижения концентрации вещества – α и β -фазы (рис. 3).

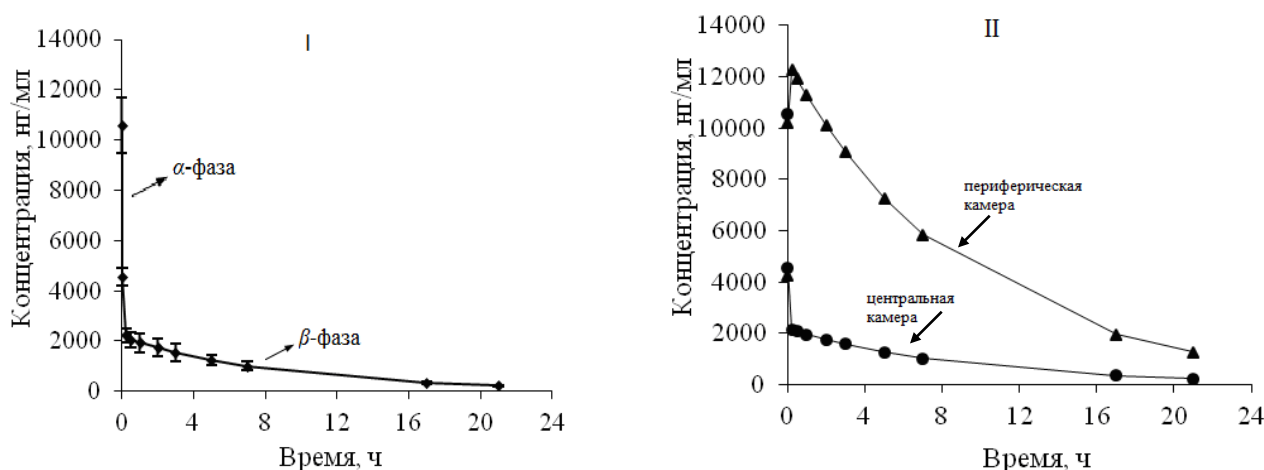


Рисунок 3 – Фармакокинетический профиль 4-метил-2,6-диизоборнилфенола (I) после внутривенного введения и его двухкамерная модель (II)

В α -фазе в течение 15 мин наблюдается резкое снижение концентрации вещества, за счет быстрого его распределения в ткани органов (фаза распределения). β -фаза характеризуется более медленным снижением концентрации соединения и описывает кинетику элиминации из организма. Полупериод распределения составил 0,4 мин, полупериод выведения – 6,3 ч.

Величина стационарного объема распределения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола V_{ss} (543,2 мл/кг) превышает объем циркулирующей крови у

крыс (70–75 мл/кг), что свидетельствует об интенсивном его проникновении в периферические ткани. Это подтверждается и соотношением констант K_{12}/K_{21} , указывающим на быстрое поступление соединения в периферическую камеру и медленное выведение из нее.

После внутривенного введения наблюдается медленная элиминация вещества из организма ($MRT = 8,5$ ч). Уравнения фармакокинетической модели представлены в таблице 2.

Результаты исследования фармакокинетики 4-метил-2,6-диизоборнилфенола после внутрижелудочного введения в водно-крахмальную суспензию в дозах 10, 20, 100 и 200 мг/кг представлены на рис. 4. Расчет фармакокинетических параметров проведен на основании построения однокамерной модели с всасыванием (таблица 2).

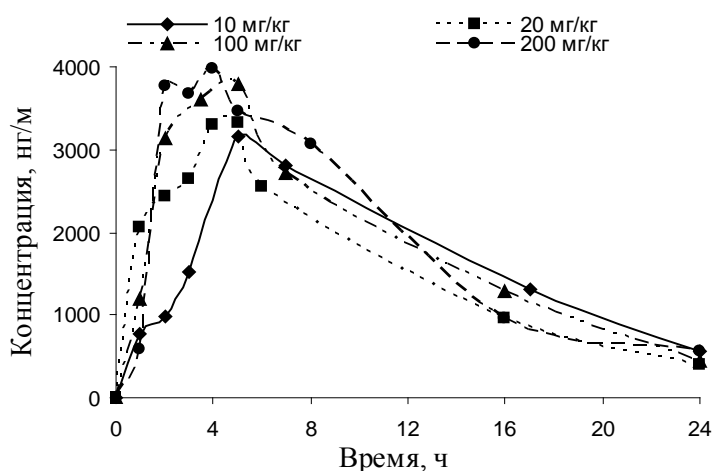


Рисунок 4 Динамика концентраций после внутрижелудочного введения в водно-крахмальную суспензию

Результаты расчетов

фармакокинетических параметров показали, что увеличение дозы вещества при внутрижелудочном введении не приводит к пропорциональному увеличению максимальной концентрации 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в

плазме крови. При введении доз 10, 20, 100 и 200 мг/кг системной циркуляции достигает соответственно 2,5, 2,4, 2,7 и 3,0 мг 4-метил-2,6-диизоборнилфенола, что свидетельствует о насыщении транспортной системы в диапазоне исследуемых доз и подтверждается обратной пропорциональной зависимостью значений биодоступности от дозы (таблица 1) и незначительным изменением скорости абсорбции вещества в ЖКТ (от 0,35 до 0,61 ч⁻¹).

При этом значения константы элиминации практически не отличаются друг от друга и варьируют в диапазоне от 0,118 до 0,102 ч⁻¹, и описываются кинетикой первого порядка вследствие линейной зависимости скорости элиминации от концентрации вещества в крови. Таким образом, кинетика всасывания и элиминации 4-метил-2,6-диизоборнилфенола после внутрижелудочного введения в крахмальной слизи незначительно зависит от дозы (в диапазоне от 10 до 200 мг/кг) и имеет схожий фармакокинетический профиль.

Таблица 1–Расчет биодоступности

Доза, мг/кг	F, %
10	25,50
20	12,02
100	2,81
200	1,50

Оценку линейности фармакокинетики проводили путем нормирования площади под фармакокинетической кривой относительно дозы (AUC/D) (рис. 5)

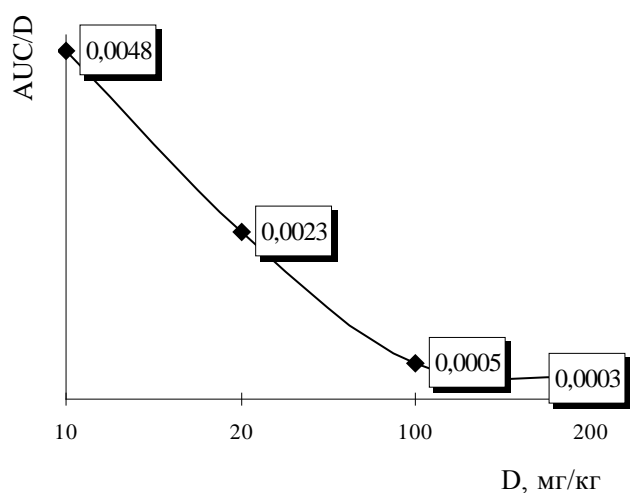


Рисунок 5 – График нормирования площади от дозы

В результате наблюдалось не соблюдение принципа суперпозиции, кроме того, достигающие системной циркуляции количество вещества не пропорционально введенной дозе. Однако такие параметры, как Cl , MRT , K_{el} , $T_{1/2el}$ инвариантны относительно введенной дозы и характеризуют линейный характер элиминации.

Проведен сравнительный анализ влияния масляной формы на степень биодоступности (рис. 6).

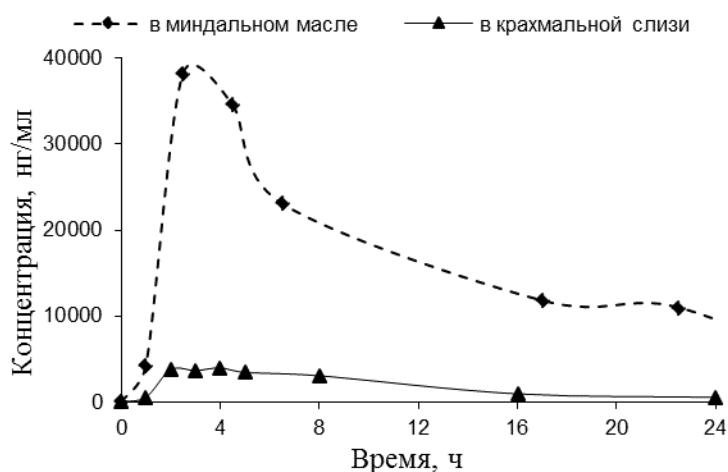


Рисунок 6 – Динамика концентраций 4-метил-2,6-диизоборнилфенола после внутрижелудочного введения в дозе 200 мг/кг в миндальном масле и крахмальной слизи

выработки природных ПАВов – желчных кислот, приводящих к увеличению степени абсорбции липофильного 4-метил-2,6-диизоборнилфенола путем мицеллярной диффузии в энтероциты.

Приведены результаты оценки биодоступности после парентерального введения (рис. 7), используемого как альтернативный путь для лекарственных соединений с низкой степенью абсорбции.

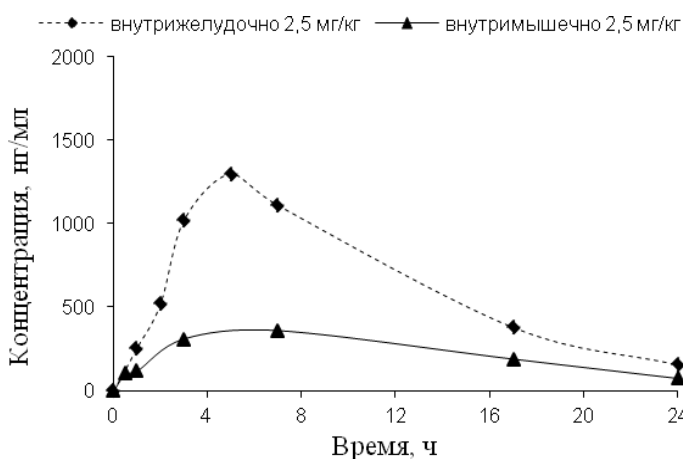


Рисунок 7 –Динамика концентраций 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в плазме крови крыс после внутрижелудочного и внутримышечного введения в миндальном масле в дозе 2,5 мг/кг

миндальном масле той же дозы в 3 раза. Установлено, что Cl , MRT , K_{el} , $T_{1/2el}$ незначительно зависят от способа введения.

В результате показано значительное увеличение биодоступности (в 8 раз) после введения в миндальном масле относительно введения в крахмальной слизи благодаря интенсивному воздействию липидной фазы на процесс эмульгирования в ЖКТ за счет стимуляции

Однако результаты фармакокинетических параметров после внутримышечного введения в миндальном масле дозы 2,5 мг/кг показали снижение биодоступности и максимальной концентрации относительно аналогичных показателей после внутрижелудочного введения в

Таблица 2–Результаты оценки фармакокинетических моделей

Способ введения	Доза, мг/кг	Раствор для введения	Уравнения фармакокинетических моделей
внутривенное	1,2	ДМСО	$C_I = 12689,1e^{-98,5t} + 2180,7e^{-0,1t}$ $C_{II} = 12593,3(e^{0,1t} - e^{-98,5t})$
внутрижелудочное	10	Крахмальная слизь	$C = 7232,93(e^{-0,102t} - e^{-0,35t})$
внутрижелудочное	20	Крахмальная слизь	$C = 5866,42(e^{-0,118t} - e^{-0,61t})$
внутрижелудочное	100	Крахмальная слизь	$C = 7008,65(e^{-0,109t} - e^{-0,50t})$
внутрижелудочное	200	Крахмальная слизь	$C = 6860,00(e^{-0,102t} - e^{-0,55t})$
внутрижелудочное	2,5	Миндальное масло	$C = 2800,00(e^{-0,113t} - e^{-0,40t})$
внутрижелудочное	200	Миндальное масло	$C = 57699,28(e^{-0,107t} - e^{-0,62t})$
подкожное	20	Миндальное масло	$C = 3370(e^{-0,100t} - e^{-0,55t})$
внутримышечное	2,5	Миндальное масло	$C = 1090,00(e^{-0,113t} - e^{-0,30t})$

Анализ динамики концентраций 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в тканях и органах крыс после внутрижелудочного введения в дозе 20 мг/кг в водно-крахмальной суспензии показал, что вещество неравномерно распределяется в организме, время достижения максимальных концентраций в тканях и органах варьирует в широком диапазоне от 3 до 24 ч. Наиболее высокие концентрации (22,81 мкг/г) наблюдаются в ткани печени через 6 ч после введения и превышают концентрацию в плазме в данной временной точке в 7 раз. Также высокий уровень концентраций наблюдается в органе-мишени – сердце, при этом время достижения максимальной концентрации (5,18 мкг/г) в сердце составляет 4 ч.

В жировой ткани в течение первых 6 ч наблюдается низкий уровень концентраций 4-метил-2,6-диизоборнилфенола, интенсивное накопление начинается только с 8 ч. Максимальная концентрация в жировой ткани (3,61 мкг/г) определяется через 24 ч после введения, что, возможно, связано с медленным перераспределением вещества из других органов.

Несмотря на то, что препарат является липофильным соединением и имеет соотношение $\text{Log}P_{\text{октано́л/вода}} = 8,14$, его проникновение в ткани мозга незначительно. Максимальная концентрация меньше плазменной в 3 раза и составляет $1,42 \text{ мкг/г}$, однако достигается быстрее, чем в других органах (к 3 ч). Таким образом, в порядке убывания максимальных концентраций 4-метил-2,6-диизоборнилфенола ткани и органы крыс можно расположить в следующей последовательности: печень ($22,81 \pm 12,69$) > сердце ($5,18 \pm 1,42$) > жировая ткань ($3,61 \pm 1,01$) > плазма ($3,32 \pm 0,49$) > почки ($3,29 \pm 0,75$) > мышцы ($2,48 \pm 1,83$) > мозг ($1,43 \pm 0,83$).

Расчет одного из наиболее важных показателей тканевого распределения – коэффициента тканевой доступности показал, что вещество обладает наибольшей органотропностью к тканям печени и сердца. Низкая степень сродства наблюдается к тканям мозга (рис. 8).

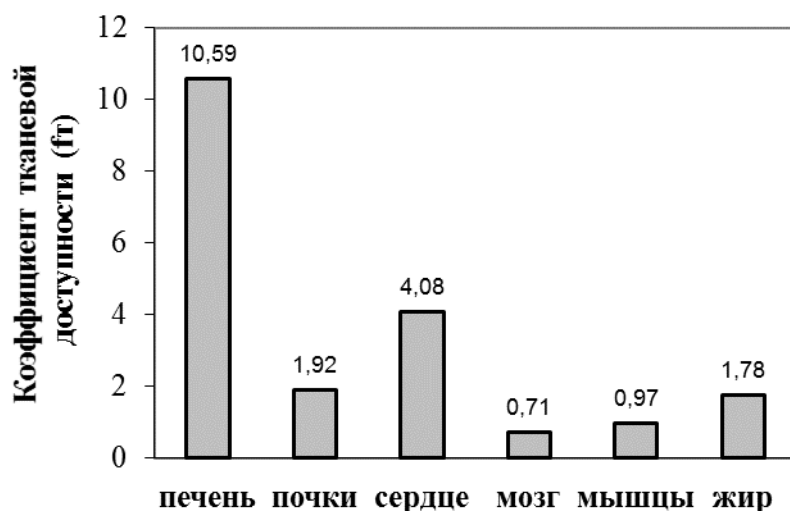


Рисунок 8 – Расчет коэффициента тканевой доступности

Изучение процесса элиминации 4-метил-2,6-диизоборнилфенола из организма показало, что вещество наиболее длительно удерживается в тканях сердца и мозга. По среднему времени удерживания (ч) препарата ткани органов можно расположить в следующем порядке: сердце ($44,90$) > мозг ($31,97$) > почки ($24,85$) > жир ($24,54$) > печень ($16,84$) > мышцы ($15,20$).

Количественное определение 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в экскретах показало, что основной путь выведения вещества через ЖКТ. В

течение 4 суток после введения в фекалиях обнаружено 81% от введённой дозы, при этом 70,2% было выведено в первые сутки (табл. 3).

Несмотря на то, что в тканях почек коэффициент тканевой доступности составил 1,8, суммарное (в течение 4 суток) количество 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в моче составило около 0,01% от введенной дозы. По-видимому, по причине гидрофобности исследуемого соединения его транспорт в мочу может осуществляться только в связанном с белковыми молекулами виде (моча крыс содержит около 10 мг белка в суточной норме).

Таблица 3 – Содержание 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в кале и моче крыс

Наименование показателя	Период после введения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола (ИБФ)				
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	4-е сутки	Суммарное
Содержание ИБФ в кале, мг	4,196±0,182	0,391±0,061	0,221±0,071	0,034±0,013	4,840±0,011
% от введенной дозы	70,2±2,8	6,8±1,0	3,0±1,2	0,6±0,2	81,0±1,3
Содержание ИБФ в моче, нг	147,8±35,2	131,0±22,4	88,8±16,3	41,2±7,2	408,7±58,3
% от введенной дозы	0,0024±0,0006	0,0021±0,0004	0,0015±0,0003	0,0007±0,0001	0,0068±0,0010

В желчи обнаружены невысокие концентрации 4-метил-2,6-диизоборнилфенола – 0,1 % от введенной дозы, что является нехарактерным для липофильных соединений и предположительно объясняется влиянием гликопротеинового слоя на апикальной поверхности стенок каникулярной мембраны гепатоцитов, препятствующего прохождению последней многим ксенобиотикам и вызывающего эффект гликопротеинового эффлюкса.

Результаты оценки связывания с белками путем компьютерного моделирования показали высокое гидрофобное сродство к молекуле альбумина с энергией связывания в диапазоне от -5,50 до -7,71 ккал/мол (рис.9). Нами не было установлено определенного сайта связывания, так как наблюдалась значительная вариабельность локализации 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в комплексе с белком, что свидетельствует об отсутствии специфического

связывания. Более детальный анализ результатов показал, что наиболее активное связывание наблюдалось в сайте IB за счет гидрофобного связывания свободных метильных групп лиганда с алифатическими и ароматическими участками аминокислотных остатков белка. Качественный анализ аминокислотных остатков, связывающихся с 4-метил-2,6-диизоборнилфенолом показал преимущественное связывание с ARG197, TYR148.

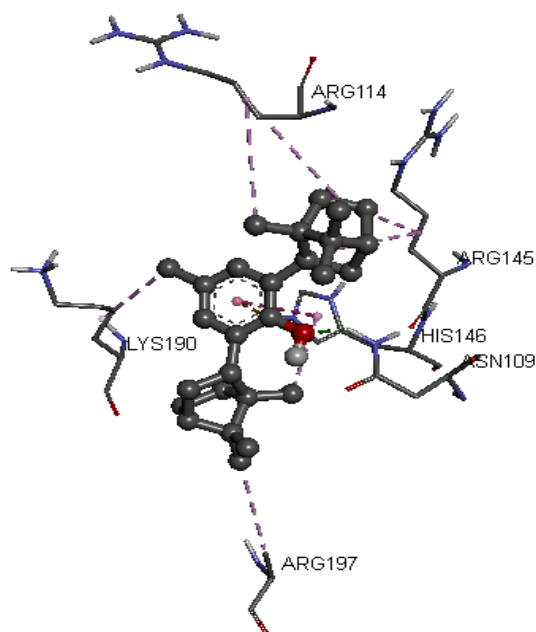


Рисунок 9 – Связывание 4-метил-2,6-диизоборнилфенола с молекулой альбумина.

Высокие концентрации в печени относительно других органов, незначительное количество в желчи свидетельствуют о необратимом процессе связывания с белками либо интенсивном процессе метаболизма 4-метил-2,6-диизоборнилфенола. Поиск метаболитов 4-метил-2,6-диизоборнилфенола осуществляли в образцах кала, желчи и мочи, в результате было обнаружено 11 метаболитов, основная часть которых представлена продуктами II фазы биотрансформации в виде конъюгатов с аминокислотами. Схема метаболизма 4-метил-2,6-диизоборнилфенола представлена на рис. 10

Относительная количественная оценка метаболитов 4-метил-2,6-диизоборнилфенола показала, что наиболее значимыми продуктами биотрансформации у крыс являются димерный конъюгат 4-метил-2,6-диизоборнилфенола (метаболит IX), а также продукт окислительного метаболизма 3,5-диизоборнил-4-гидроксibenзальдегид (метаболит II), продукт

II фазы биотрансформации конъюгат серина (метаболит XI) и неидентифицированный с $m/z = 489$ (метаболит VII).

Судя по большому количеству димера в кале и отсутствию этого метаболита в желчи, димер является продуктом биотрансформации 4-метил-2,6-диизоборнилфенола кишечной микрофлорой.

Минорным метаболитом 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в кале является конъюгат глюкуроновой кислоты и продукта окислительного метаболизма исследуемого соединения 3,5-диизоборнил-4-гидроксибензойной кислоты (метаболит IV). В небольшом количестве в кале содержатся продукты окислительного метаболизма исследуемого соединения 3,5-диизоборнил-4-гидроксибензиловый спирт и 3,5-диизоборнил-4-гидроксибензоальдегид. Судя по отсутствию неконъюгированных метаболитов этих соединений в желчи, появление 3,5-диизоборнил-4-гидроксибензилового спирта и 3,5-диизоборнил-4-гидроксибензоальдегида в кале связано с разрушением конъюгатов этих соединений, поступивших в кишечник с желчью, микрофлорой кишечника.

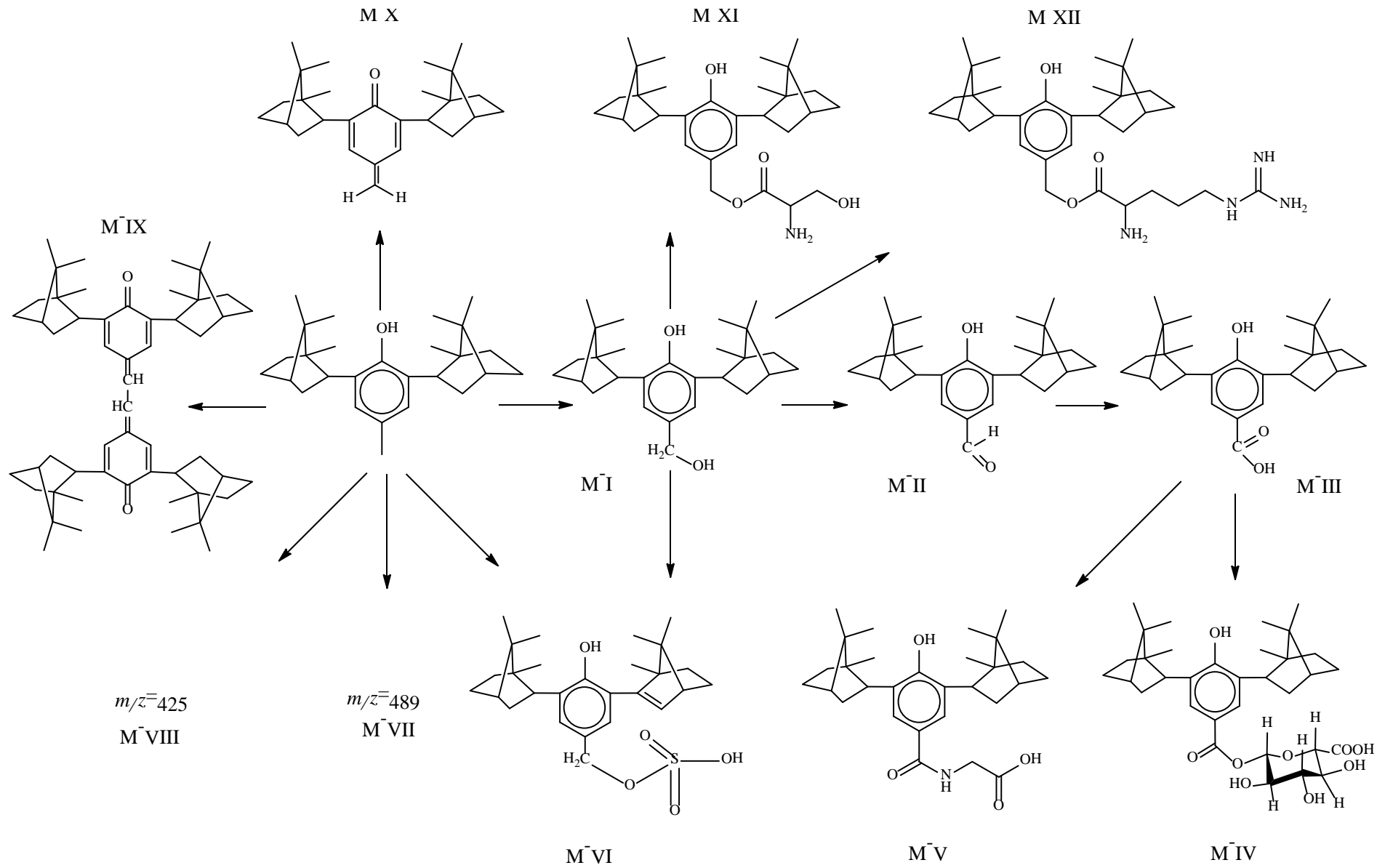


Рисунок 10 – Схема метаболизма 4-метил-2,6-диизоборнилфенола

Выводы

1. Разработан селективный, высокочувствительный аналитический метод количественного определения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола и его метаболитов в биологическом материале на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием флуориметрического и масс-спектрометрического детектирования.
2. В результате исследования фармакокинетики 4-метил-2,6-диизоборнилфенола установлено, что процесс абсорбции соединения имеет нелинейный характер. 4-Метил-2,6-диизоборнилфенол обладает низкой биодоступностью после внутрижелудочного введения в крахмальную слизь, а также после подкожного и внутримышечного введения в миндальном масле. Показано увеличение биодоступности соединения при внутрижелудочном введении в 7,9 раз после замены водной дисперсионной фазы на масляную.
3. Результаты исследования тканевого распределения 4-метил-2,6-диизоборнилфенола показали интенсивное проникновение в ткани печени и сердца. Наблюдалась низкая степень прохождения через гематоэнцефалический барьер и медленное достижение максимальных концентраций в тканях почек, жира и мышц.
4. Исследованы пути экскреции неизмененного 4-метил-2,6-диизоборнилфенола. Установлено, что основная часть от введенной дозы (70%) выводится в течение первых суток с фекалиями. На протяжении 4 суток исследования в моче крыс обнаружено незначительное количество вещества – не более 0,007% от введенной дозы.
5. При исследовании метаболизма 4-метил-2,6-диизоборнилфенола обнаружены 11 метаболитов – продукты окисления и продукты II фазы биотрансформации в виде конъюгатов с аминокислотами. Доминирующим метаболитом является димерный конъюгат 4-метил-2,6-диизоборнилфенола.

6. Путем компьютерного моделирования проведена оценка связывания 4-метил-2,6-диизоборнилфенола с молекулой альбумина. Установлено активное гидрофобное взаимодействие соединения с аминокислотными остатками ARG197, TYR148 в сайте связывания IB.
7. Наиболее высокая биодоступность взвеси 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в масле (38,5%) позволяет рекомендовать создание лекарственной формы на липидной основе для перорального применения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Яновская, Е.А.** Исследование фармакокинетики 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в плазме крови крыс при внутривенном введении / **Е.А. Яновская**, Г.А. Чернышева, В.И. Смольякова и др. // Первая конференция серии ChemWasteChem: «Химия и полная переработка биомассы леса». – Санкт-Петербург (Репино), 2010 г – С. 162–163.
2. Чернышева, Г.А. Фармакокинетика фенольного антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола при внутривенном введении / Г.А. Чернышева, В.И. Смольякова, М.Б. Плотников, **Е.А. Яновская** и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Том 74, № 9. – С.20–22.
3. **Яновская, Е.А.** Оценка линейности фармакокинетики нового фенольного антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола / **Е.А. Яновская**, Г.А. Чернышева, В.И. Смольякова, Р.В. Гурто // IV съезд фармакологов России «Инновации в современной фармакологии»: Материалы съезда. – Казань, 2012. – С. 207.
4. **Яновская, Е.А.** Исследование фармакокинетики нового фенольного антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола / **Е.А. Яновская** // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии: Материалы конференции молодых ученых / под ред. Г.Н. Зюзькова. – Томск, 2012. – С .58–60.
5. Чернышева, Г.А. Абсорбция и экскреция нового антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола / Г.А. Чернышева, В.И. Смольякова, **Е.А. Яновская** и др. // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: Труды XXI международной конференции и дискуссионного клуба. – Гурзуф, 2013. – С. 137–138.
6. **Яновская, Е.А.** Распределение 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в тканях и органах крыс / **Е.А. Яновская** // Первая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств»: Материалы конференции. – Москва, 2013. – С.145.

7. **Яновская, Е.А.** Экскреция и метаболизм нового фенольного антиоксиданта / **Е.А. Яновская**, В.И. Смольякова, Г.А. Чернышева и др. // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: Труды XXII международной конференции и дискуссионного научного клуба. – Гурзуф, 2014. – С. 102–103.
8. Смольякова, В.И. Оценка линейности фармакокинетики фенольного антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола при внутрижелудочном введении / В.И. Смольякова, Г.А. Чернышева, **Е.А. Яновская** и др. // Эксп. и клин. фарм. – 2014. – Том 77, № 2. – С.31–34.
9. Смольякова, В.И. Распределение 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в тканях и органах крыс / В.И. Смольякова, Г.А. Чернышева, **Е.А. Яновская** и др. // Эксп. и клин. фарм. – 2014. – Т. 77, № 9. – С.28–31.
10. **Яновская, Е.А.** Фармакокинетика нового фенольного антиоксиданта 4-метил-2,6-диизоборнилфенола / **Е.А. Яновская**, Г.А. Чернышева, В.И. Смольякова и др. // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной XXIII конференции и дискуссионного научного клуба. – Гурзуф, 2015. – С. 36–41.
11. **Яновская, Е.А.** Фармакокинетика 4-метил-2,6-диизоборнилфенола у крыс / **Е.А. Яновская**, Г.А. Чернышева, В.И. Смольякова и др. // Проблемы развития высоких технологий. *PhysioMedi*: сборник статей восьмой международной научно-практической конференции. – Санкт-Петербург, 2015. – С.169–170.