

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МІЖТКАНИННИХ КОНСТАНТ РОЗПОДІЛУ ЕТАНОЛУ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТІВ, ЩО ВИЗНАЧЕНІ МЕТОДАМИ АСИМПТОТИЧНОГО НАБЛИЖЕННЯ, ПЛОЩ ПІД ФАРМАКОКІНЕТИЧНИМИ КРИВИМИ ТА ЇХ КОМБІНАЦІЇ

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса

Розподіл ліків між органами та тканинами організму є складним процесом, що залежить від багатьох факторів: фізико-хімічних властивостей речовини, певних структурних особливостей органа (ступінь васкуляризації органа чи тканини, інтенсивності перебігу метаболічних процесів, наявність гістогематичних бар'єрів або систем активного прямого чи зворотного транспорту та ін.) [1; 2]. У рамках загального апарату фармакокінетики процеси масопереносу у внутрішньому середовищі організму можуть бути виражені за допомогою констант міжкамерного розподілу, які, проте, є фіктивними величинами, оскільки до однієї камери можуть бути включені різні органи з близькими фармакокінетичними характеристиками. Більш раціональним з цього боку є використання такого показника, як константа розподілу між певним органом чи тканиною та плазмою крові завдяки безпосередньому наближенню до фізіологічного розподілу речовини в організмі в умовах сталого стану [3]. Існує кілька методів визначення констант розподілу, що мають свої підходи і використовують вхідні дані, які є експериментальними, з відповідною точністю. Беручи до уваги те, що для певних органів, зокрема, головного мозку, ступінь надходження речовини з крові є важливим показником ефективності прояву фармакологічної дії, аналіз і порівняння цих методів набувають суттєвого методичного значення.

**Метою** даної роботи є порівняльна оцінка методів визначення констант розподілу етанолу та його метаболітів — ацетальдегіду й оцтової кислоти — між плазмою крові та головним мозком, що характеризує особливості їх проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ).

### Матеріали та методи дослідження

Досліди проводилися на мишах масою 20–26 г, яких утримували в умовах вільного доступу до води та добової депривації їжі перед експериментом. Речовини, що досліджувалися ( $1^{14}\text{C}$ -етанол,  $1^{14}\text{C}$ -ацетальдегід і  $2^{14}\text{C}$ -оцтова кисло-

та, питома активність 0,23, 0,14 та 0,31 Ки/моль відповідно), вводили внутрішньовенно або перорально (інтрагастрально) у твіновій емульсії (Tween 80). Через певний проміжок часу тварин декапітували, зразки крові відбирали у попередньо гепаринізовані пробірки та центрифугували (4 тис. об/хв, 15 хв) для виділення формених елементів. До отриманої плазми ( $0,2\text{ см}^3$ ) додавали  $0,1\text{--}0,2\text{ см}^3$  Triton X-100,  $10\text{ см}^3$  сцинтилятора та визначали вміст радіоактивності на рідинному сцинтиляційному фотометрі Canberra PACKARD TRI CARB 2700. Таким же чином визначали вміст радіоактивного матеріалу у гомогенатах головного мозку ( $1 : 4$ , NaCl, 0,9 %,  $0,2\text{--}0,4\text{ см}^3$ ) і розраховували питомий вміст радіоактивного матеріалу у плазмі крові (мкМоль/ $\text{см}^3$ ) або головному мозку (мкМоль/г). Отримані дані оброблені статистично за допомогою пакета програм MS Excel.

### Результати дослідження та їх обговорення

При попередньому дослідженні фармакокінетики етанолу [4; 5], ацетальдегіду й оцтової кислоти [6] було встановлено, що для всіх цих сполук характерними є двофазний характер розподілу у плазмі крові та головному мозку, інтенсивне зниження концентрації у першій фазі (час напіврозподілу становить  $(0,60 \pm 0,03)$ ,  $(0,27 \pm 0,04)$  та  $(0,14 \pm 0,02)$  год $^{-1}$  відповідно за даними у плазмі крові) при внутрішньовенному введенні та швидке всмоктування у шлунково-кишковому тракті (ШКТ) при інтрагастральному введенні. Наявність двофазного характеру розподілу цих сполук у головному мозку та плазмі крові, а також близькі значення відповідних фармакокінетичних показників дозволяють об'єднати їх до одного відсіку кінетичної схеми й розглядати процеси розподілу речовин між ними (принаймні, у тривалому часі) як рівноважні, на підставі чого можливе застосування трьох методів визначення констант розподілу ( $k_p$ ) речовин між плазмою крові та головним мозком.

1. Визначення  $k_p$  за співвідношенням концентрацій у мозку та плазмі крові (асимптотичне наближення)

За умов рівноважного розподілу речовини між плазмою крові й органом (головний мозок) відповідні концентрації речовини в об'єктах дослідження зумовлені кількома факторами (як фізико-хімічними, так і біологічними), головним з яких є ліпофільність молекули. Сполуки з високим значенням  $\log P$  нагромаджуються у жировій тканині, тимчасом як у плазмі крові їх концентрація є малою, та навпаки, для гідрофільних сполук їх об'єм розподілу наближається до загального об'єму крові. На підставі цього можна визначити  $k_p$  як співвідношення концентрацій речовини, що досліджується, у головному мозку та плазмі крові через певний проміжок часу після введення (1), але на практиці використовується співвідношення середньої концентрації речовини протягом певного проміжку часу (2), за який досягається встановлення рівноваги (рис. 1, а):

$$k_p = \frac{C_t^{\text{мозок}}}{C_t^{\text{плазма}}}, \quad (1)$$

$$k_p = \frac{\bar{C}_t^{\text{мозок}}}{\bar{C}_t^{\text{плазма}}}, \quad (2)$$

де  $C_t^{\text{мозок}}$  і  $C_t^{\text{плазма}}$  — концентрація речовини у мозку та плазмі крові у час  $t$ .

Оскільки розрахункове значення  $k_p$  при аналізі окремих даних при тривалому часі асимптотично наближається до реальної величини, цей метод на здобув назви асимптотичного.

Аналіз фармакокінетики етанолу та його основних метаболітів — ацетальдегіду й оцтової кислоти (табл. 1–3) — цим методом демонструє, що збільшення дози речовини, яка вводиться інтрагастрально, призводить до зменшення її кількості, що надходить у головний мозок. Зважаючи на те, що величина  $k_p$  при внутрішньовенному введенні є максимальною, можливе пояснення цього — зменшення кількості речовини, що всмоктується у ШКТ. У випадку етанолу (див. табл. 1) різниця між значеннями  $k_p$  не є статистично вірогідною, тимчасом як для ацетальдегіду (див. табл. 2) при інтрагастральному введенні цей показник змінюється практично у 1,5 рази, а при введенні оцтової кислоти (див. табл. 3) — майже у 5 разів і не є пропорційним до дози сполуки, що вводилася. Вочевидь, це зумовлене зростанням концентрації радіоактивного матеріалу у плазмі крові зі збільшенням дози та зменшенням ефективної кількості речовини, що долає ГЕБ. Слід брати до уваги також той факт, що у низці «етанол-ацетальдегід-оцтова кислота» етанолу притаманний найповільніший процес метаболізму (що здійснюється за допомогою алкогільдегідрогенази та при певній концентрації субстрату описується кінетикою нульового по-

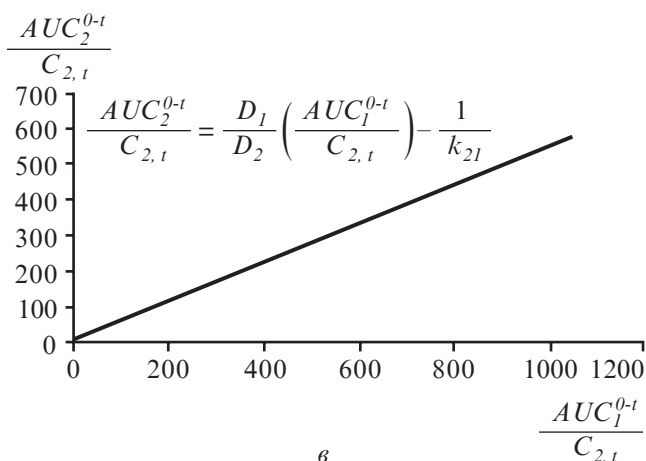
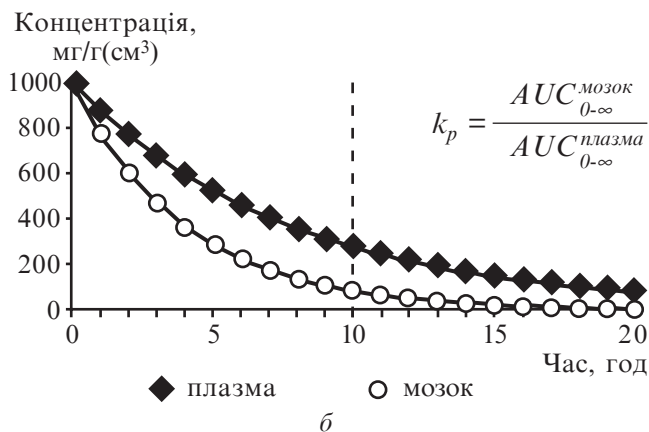
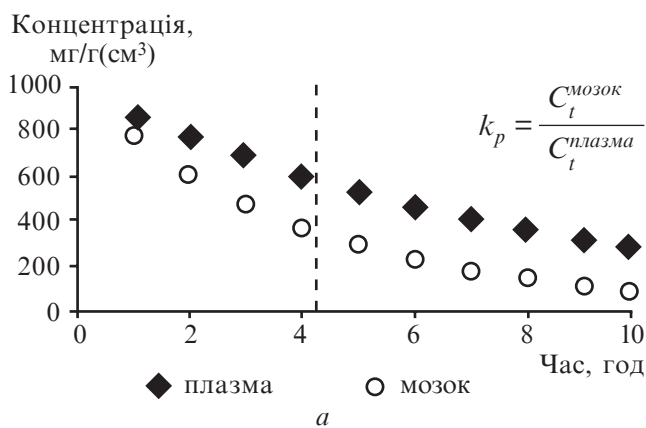


Рис. 1. Схематичне графічне зображення методів визначення константи розподілу ( $k_p$ ) між кров'ю та головним мозком: а — асимптотичний метод співвідношення концентрацій; б — метод порівняння площ під концентраційними кривими у відповідному органі; в — комбінований метод аналізу зростання інтервалів під концентраційними кривими

ряду [7; 8]), тимчасом як ацетальдегід досить швидко окиснюється до оцтової кислоти [9] (насичення альдегіддегідрогеназ здійснюється при значно великих концентраціях субстрату [10]), а сама оцтова кислота у вигляді ацетату бере участь у багатьох метаболічних перетвореннях [11]. Внаслідок цього значення  $k_p$  для етанолу є близькими, тимчасом як для ацетальдегіду, а ще більше для оцтової кислоти, на розрахунок  $k_p$  впливає збільшення кількості інших метаболітів.

Таблиця 1

**Розрахунок константи розподілу ( $k_p$ ) етанолу між плазмою крові та головним мозком різними методами**

Метод розрахунку $k_p$	Доза та шлях введення		
	5 мМоль/кг, внутрішньовенне	20 мМоль/кг, внутрішньовенне	20 мМоль/кг, інтрагастральне
Співвідношення концентрацій	1,11± ±0,13	0,84± ±0,09	0,78± ±0,02
Співвідношення інтервалів (площ під фармакокінетичними кривими)	1,05± ±0,18	1,46± ±0,26	1,82± ±0,41
Співвідношення площ, що зростають відповідно до концентрації	1,06± ±0,20	0,78± ±0,13	0,79± ±0,19

Недоліком методу визначення  $k_p$  за співвідношенням концентрацій речовини у плазмі та мозку слід вважати суб'єктивну оцінку вибору часових інтервалів, коли досягається рівновага у процесах масопереносу, а також значне відхилення початкових концентрацій сполуки одразу після введення та використання тільки певної частини експериментальних даних.

*2. Визначення  $k_p$  за співвідношенням інтервалів концентрацій (площ під фармакокінетичними кривими) у мозку та плазмі крові*

Формально подібним до першого методу є використання як показника, що відбиває кількість речовини у мозку чи плазмі крові, не концентрації у певний момент часу, а її інтегральної характе-

ристики — площі під всією фармакокінетичною кривою вмісту речовини (див. рис. 1, б). Величина  $k_p$  визначається так:

$$k_p = \frac{\int_0^{\infty} C(t)_{\text{мозок}}}{\int_0^{\infty} C(t)_{\text{плазма}}} = \frac{AUC_{0-\infty}^{\text{мозок}}}{AUC_{0-\infty}^{\text{плазма}}}, \quad (3)$$

де  $AUC_{\text{мозок}}$  і  $AUC_{\text{плазма}}$  — площі під фармакокінетичними кривими вмісту речовини, що досліджується, у головному мозку чи плазмі крові відповідно. На практиці величину  $AUC_{0-\infty}$  визначають як суму площ під концентраційною кривою речовини в органі (чи тканині) протягом експерименту (розраховується методом трапецій) та площею під термінальною ділянкою кривої (як співвідношення термінальної концентрації речовини в органі до константи її елімінації,  $k_{el}$ ):

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty} = C_t t_1 + \sum_{i=t_2}^t \frac{C_i + C_{i+1}}{2} (t_{i+1} - t_i) + \frac{C_t}{k_{el}} \quad (4)$$

Таким чином, при аналізі використовується весь набір експериментальних даних, а також враховується загальна динаміка процесу виведення речовини з органа, що впливає на коливання її концентрації протягом часу.

Застосування цього методу при аналізі експериментальних даних із фармакокінетики етанолу, ацетальдегіду й оцтової кислоти дозволяє визначити певні відмінності у характері розподілу цих речовин (див. табл. 1–3). Так, у разі етанолу (див. табл. 1) помітне невірогідне зростання величини  $k_p$  при зміні шляху його введення, тимчасом як при внутрішньовенному введенні доз

Таблиця 2

**Розрахунок константи розподілу ( $k_p$ ) ацетальдегіду між плазмою крові та головним мозком різними методами**

Метод розрахунку $k_p$	Доза та шлях введення			
	10 мМоль/кг, внутрішньовенне	10 мМоль/кг, інтрагастральне	20 мМоль/кг, інтрагастральне	40 мМоль/кг, інтрагастральне
Співвідношення концентрацій	2,24± ±0,37	3,51± ±0,27	1,50± ±0,18	1,27± ±0,19
Співвідношення інтервалів (площ під фармакокінетичними кривими)	2,05± ±0,52	5,68± ±0,72	1,55± ±0,32	1,21± ±0,33
Співвідношення площ, що зростають відповідно до концентрації	2,11± ±0,59	2,87± ±0,37	1,31± ±0,25	1,22± ±0,30

Таблиця 3

**Розрахунок константи розподілу ( $k_p$ ) оцтової кислоти між плазмою крові та головним мозком різними методами**

Метод розрахунку $k_p$	Доза та шлях введення			
	2 мМоль/кг, внутрішньовенне	2 мМоль/кг, інтрагастральне	5 мМоль/кг, інтрагастральне	10 мМоль/кг, інтрагастральне
Співвідношення концентрацій	21,41± ±3,92	17,19± ±3,98	3,48± ±0,65	3,24± ±0,53
Співвідношення інтервалів (площ під фармакокінетичними кривими)	—	7,36± ±0,39	2,31± ±0,01	3,98± ±1,06
Співвідношення площ, що зростають залежно від концентрації	14,85± ±4,39	17,20± ±7,45	5,53± ±1,22	4,61± ±1,56

ця різниця є значно меншою. Пояснюється це тим, що основний метаболізм етанолу здійснюється у печінці [7; 8], тому нагромадження радіоактивних метаболітів при інтрагастральному шляху введення (коли вся доза речовини після всмоктування у ШКТ проходить через печінку) є значно більшим, ніж при внутрішньовенному введенні.

Навпаки, значення  $k_p$  ацетальдегіду (див. табл. 2), маючи загальну тенденцію до зниження зі зростанням дози, що вводиться, подібні до тих, що визначені за допомогою методу співвідношення концентрацій. У цьому разі найбільша розбіжність між даними спостерігається при введенні низьких доз ацетальдегіду, а при великих дозах розраховані різними методами значення  $k_p$  збігаються. Можна вважати, що пов'язане це зі зміною кількості радіоактивних метаболітів, які знаходяться у крові під час ензиматичного окиснення ацетальдегіду до оцтової кислоти [6].

Для неї спостерігається найбільше значення константи розподілу  $k_p$ , що зумовлене її спроможністю надходити до головного мозку (див. табл. 3). Зважаючи на гідрофільний характер речовини за умов внутрішнього середовища організму, а також зменшення  $k_p$  при збільшенні дози, що вводиться (за рахунок збільшення радіоактивного матеріалу у плазмі крові), ймовірно є наявність активного транспорту ацетату крізь ГЕБ та досягнення цим процесом насичення в інтервалі використаних доз [6].

Взагалі, одним із суттєвих джерел похибки у цьому методі є використання останнього члена у рівнянні (4) та досить низьке значення концентрації речовини, що наприкінці експерименту занижує цей показник, а його збільшення (яке відбувається частіше, наприклад, за рахунок нагромадження радіоактивних метаболітів) значно підвищує його внесок у загальну величину  $AUC$ . Менш важливою є похибка при розрахунку  $AUC$  впродовж часу експерименту — лінійна апроксимація на ділянці кривої, що знижується, призводить до деякого збільшення площі, але це стає досить критичним у разі значно великих часових інтервалів між взяттям проб.

### 3. Визначення $k_p$ комбінованим методом з урахуванням зростання інтервалів концентрацій (площ під фармакокінетичними кривими) речовини у плазмі крові та головному мозку

Теоретичним обґрунтуванням цього методу є використання диференційного рівняння вмісту досліджуваної речовини у плазмі крові та головному мозку [12]:

$$\frac{dA_{2,t}}{dt} = k_{12}A_{1,t} - k_{21}A_{2,t},$$

де  $A_{1,t}$  і  $A_{2,t}$  — вміст речовини у плазмі крові та головному мозку відповідно;  $k_{12}$  і  $k_{21}$  — константи надходження речовини з плазми крові та головного мозку.

Інтегруванням цього рівняння за часом  $t$  і урахуванням того, що  $A_{2,t} = C_{2,t}V_2$ , перегрупуванням і заміною інтегралів на їх наближені значення площ під концентраційними кривими отримуємо:

$$\frac{AUC_2^{0-t}}{C_{2,t}} = \frac{D_1}{D_2} \left( \frac{AUC_1^{0-t}}{C_{2,t}} \right) - \frac{1}{k_{21}} \quad (5)$$

Регресійне рівняння є лінійним за будь-якого часу дослідження, а регресійні коефіцієнти дозволяють визначити важливі характеристики процесів масопереносу між тканинами, зокрема  $k_p$  (як кут нахилу прямої, див. рис. 1, в) [12].

Використання цього методу при аналізі розподілу етанолу та його метаболітів між плазмою крові та головним мозком демонструє (див. табл. 1–3), що визначене значення  $k_p$  збігається із показниками, отриманими іншими методами. Так, у разі етанолу встановлено, що завдяки повноті його всмоктування у ШКТ і насиченню процесів його біотрансформації та надходження до головного мозку введення навіть високих доз (20 мМоль/кг, див. табл. 1) не призводить до зміни у розподілі між плазмою крові та головним мозком, як це вважалося при використанні як аналітичного апарату методу співвідношення концентрацій. Навпаки, введення доз ацетальдегіду, що збільшуються, приводить до поступового (а в інтервалі доз від 20 до 40 мМоль/кг — невиразного та статистично невірогідного) зменшення його надходження до головного мозку, що відбивається зменшенням  $k_p$ . У разі оцтової кислоти цей метод надав змогу оцінити значення  $k_p$ , незважаючи на значні коливання концентрації речовини у головному мозку та плазмі крові тварин протягом експерименту. Загалом, цей метод дозволяє отримувати стабільні результати, використовуючи дані усього концентраційного профілю й уникати похибки, пов'язаної або з асимптотичним наближенням, або з неточним визначенням термінальної концентрації.

Наведені методи визначення  $k_p$  можуть використовуватись як самостійно, так і разом. Вибір кожного конкретного методу залежить від умов проведення експерименту й отриманих даних, але найбільш доцільним і зручним є застосування комбінованого методу з урахуванням зростання інтервалів (площ під фармакокінетичними кривими) концентрацій речовини у плазмі крові та головному мозку.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Golden P. L. Blood-brain barrier efflux transport / P. L. Golden, G. M. Pollack // J. Pharm. Sci. — 2003. — Vol. 92. — P. 1739-1753.
2. Головенко Н. Я. Физико-химическая фармакология / Н. Я. Головенко. — Одесса : Астропринт, 2004. — 720 с.
3. Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability / X. Liu, M. Tu, R. S. Kelly [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2004. — Vol. 32, N 1. — P. 132-139.

4. *Особливості фармакокінетики етанолу в організмі білих мишей* / М. Я. Головенко, В. Б. Ларіонов, І. Ю. Борисяк, О. Б. Ліхота // Медична хімія. — 2007. — Т. 2, № 2. — С. 60-63.

5. *Ларіонов В. Б.* Співвідношення мозок/плазма крові концентрацій етанолу при його внутрішньовенному та інтрагастральному введенні мишам / В. Б. Ларіонов // Досягнення біології та медицини. — 2007. — № 2 (10). — С. 42-46.

6. *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids* / ed. J. H. Cummings, J. L. Rombeau, T. Sakata. — Cambridge University Press, 1995. — 575 p.

7. *Wagner J. G.* Parameters  $V_m$  and  $K_m$  for elimination of alcohol in young male subjects / J. G. Wagner, P. Wilkinson, D. Ganes // Alcohol and Alcoholism. — 1989. — Vol. 24. — P. 555-564.

8. *Umulis D.* A physiology based model for ethanol and acetaldehyde metabolism in human beings / D. Umulis,

N. Giirmen, P. Singh // Alcohol. — 2005. — Vol. 35. — P. 3-12.

9. *Влияние ацетальдегида на этанол- и ацетальдегид-метаболизирующие системы печени и мозга крыс* / Л. Р. Бардина, Л. С. Пронько, В. И. Сатановская, А. Б. Козьмич // Український біохімічний журнал. — 2003. — Т. 75, № 6. — С. 129-133.

10. *Sippel H.* The role of acetaldehyde in the actions of ethanol / H. Sippel, C. Eriksson // The Finnish Foundation for Alcohol Studies. — 1975. — Vol. 23. — P. 149-157.

11. *Cumming J. H.* Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids / J. H. Cumming, J. L. Rombeau, Takashi Sakata // Cambridge University Press, 2004. — 575 p.

12. *Зінковський В. Г.* Розробка методів позамоделного аналізу процесів розподілу ксенобіотиків між кров'ю, органами й тканинами при їхньому одноразовому введенні в організм / В. Г. Зінковський, С. І. Шукін // Досягнення біології та медицини. — 2005. — № 2 (6). — С. 27-32.

УДК 577.151.121:092.9

В. Б. Ларіонов

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МІЖТКАНИННИХ КОНСТАНТ РОЗПОДІЛУ ЕТАНОЛУ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТІВ, ЩО ВИЗНАЧЕНІ МЕТОДАМИ АСИМПТОТИЧНОГО НАБЛИЖЕННЯ ПЛОЩ ПІД ФАРМАКОКІНЕТИЧНИМИ КРИВИМИ ТА ЇХ КОМБІНАЦІЇ**

Використання констант розподілу між органами та кров'ю, завдяки безпосередньому наближенню до фізіологічного розподілу, є одним із зручних засобів кількісної оцінки масопереносу речовин. Метою роботи була порівняльна оцінка методів визначення констант розподілу для етанолу, ацетальдегіду й оцтової кислоти.

Досліди проводилися на білих мишах-самцях,  $^{14}\text{C}$ -речовини вводили інтрагастрально та перорально у різних дозах, вміст радіоактивного матеріалу визначали методом рідинної сцинтиляційної фотометрії.

Встановлено, що комбінація методів асимптотичного наближення та площ під фармакокінетичними кривими є найбільш зручним методом визначення константи розподілу.

**Ключові слова:** етанол, ацетальдегід, оцтова кислота, константа розподілу.

UDC 577.151.121:092.9

V. B. Lariionov

**THE COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF THE DISTRIBUTION CONSTANTS FOR ETHANOL AND ITS METHABOLITES, DETERMINED BY THE METHODS OF ASYMPTOTIC APPROXIMATION, AREAS UNDER THE CURVES AND THEIR COMBINATION**

The using of the distribution constants between organs and blood because of its physiological base is one of the useful methods for substance mass-balance evaluation. The aim of this work was comparative estimation of distribution constant determination methods for ethanol, acetaldehyde and acetic acid.

Experiments were carried out on white male mice.  $^{14}\text{C}$  substances were administered intragastrally and intravenously in different doses. The radioactive compounds quantity was detected with the liquid scintillation photometry.

It was shown that combination of both asymptotic method and method of areas under the curves is the most useful for distribution constant determination.

**Key words:** ethanol, acetaldehyde, acetic acid, distribution constant.

УДК 616.12-008+616.153.1

Н. Г. Малюкова, канд. мед. наук

## **КОРЕЛЯЦІЙНІ ЗВ'ЯЗКИ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ КРОВІ З ПОКАЗНИКАМИ ГОМЕОСТАЗУ ПРИ ХРОНІЧНІЙ СЕРЦЕВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ**

*Запорізька медична академія післядипломної освіти*

Сьогодні відзначається зростання кількості хворих із хронічною серцевою недостатністю (ХСН) і підвищення летальності від цієї недуги. Лікування ХСН, незважаючи на величезну кількість досліджень, і до-

тепер є проблемою сучасної медицини. Безпосередньою причиною декомпенсації ХСН (незалежно від нозологічної форми, що лежить в основі ураження серцево-судинної системи) можуть бути різні стани, які са-

мі по собі звичайно не призводять до ХСН [1]. В останні роки встановлено, що видужання при патологічному процесі відбувається за рахунок органів і систем, не утягнутих у сферу uszkodження завдяки інтегруючій