

Принципы, лежащие в основе новых методов прогноза токсичности ксенобиотиков с использованием данных фармако-, токсикокинетики

¹Рембовский В.Р., ²Антонова О.М., ²Вашурин Е.А., ²Фоменко Н.А., ²Алешина О.И.

¹*Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства. 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолровский, ст. Капитолово, корп. №93, тел. (812)449-61-77, e-mail: niigpech@rihophe.ru*

²*Федеральное бюджетное учреждение «33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт Министерства обороны Российской Федерации». 412918, Саратовская область, г. Вольск-18, ул. Краснознаменная д.1*

Резюме. Обоснованы и сформулированы принципы, лежащие в основе концепции разработки нового метода прогноза токсичности ксенобиотиков для человека с использованием фармакокинетики исследуемых соединений. Установлена внутривидовая вариабельность элиминации карбамазепина у млекопитающих. Показано, что токсикокинетические параметры ксенобиотика связаны с его токсичностью.

Ключевые слова: прогноз токсичности ксенобиотиков, внутривидовая вариабельность, фармакокинетика карбамазепина.

The principles which underlie the new methods of xenobiotics toxicity prognosis with using of pharmaco- and toxicokinetics data

¹Rembovsky VR, ²Antonova OM, ²Vashurin EA, ²Fomenko NA, ²Aleshina OI.

¹Research Institute of Hygiene of Human Occupational Pathology and Ecology

²33 Central Research and Test Institute of the Ministry of Defense of Russian

Abstract. The principles which underlie the concept of development of the new method xenobiotics toxicity prognosis for human which using of investigating compounds pharmacokinetics are substantiated and formulated. The intraspecific variability of carbamazepine elimination of mammal is established. It is shown that toxicokinetic parameters of xenobiotics is bound up with toxicity.

Key words: toxicity prognosis of xenobiotics, intraspecific variability, pharmacokinetic of carbamazepine.

ВВЕДЕНИЕ

Попытки использовать данные токсикокинетики в оценке токсичности вещества при экстраполяции экспериментальных данных, полученных на животных, применительно к человеку не всегда заканчивались успехом, вследствие существенных допущений, предложенных в ранее разработанных моделях 70 - 90-х годов прошлого столетия. Как правило, экстраполяцию полученных в эксперименте данных предлагалось проводить с использованием константы биологической активности [1, 2], либо путем сравнительных исследований фармакокинетических параметров у млекопитающих с последующим прямым переносом токсикометрических характеристик с наиболее близкого вида животных по отношению к человеку [3, 4, 5, 6, 7], что в результате негативно отражалось на прогнозных характеристиках токсичности. Наиболее удачными подходами по изучению зависимостей токсикодинамических и токсикокинетических процессов при построении моделей с учетом межвидовых особенностей признаны модели, предложенные Ингом и Детриком [8, 9]. Одновременно отмечалось, что широкое использование современных хроматографических методов исследования позволило выявить существенные внутри- и межвидовые различия токсикокинетики веществ в результате повышения чувствительности и точности определения концентрации ксенобиотиков в крови. Вследствие этого в научной литературе появились работы по изучению внутривидовых особенностей фармако- и токсикокинетики ксенобиотиков, констатирующие необходимость развития исследований по изучению «индивидуальных биохимических профилей», направленных на уменьшение частоты развития патологии или исключение вероятности ухудшения здоровья человека при химических воздействиях [7, 10, 11, 12].

Актуальность разработки новых способов определения вероятной токсичности ксенобиотиков применительно к человеку обусловлена необходимостью обеспечения более надежного и достоверного способа прогноза их токсичности, анализ результатов которого может быть использован в интересах практической медицины на стадии доклинических исследований, например, при обосновании количественных аспектов лекарственной терапии. Перспективным направлением в решении проблемы прогноза токсичности ксенобиотиков

применительно к человеку могут стать исследования, связанные с изучением поглощения, распределения и выведения веществ из организма с использованием метода фармзондирования. В этом случае открывается возможность изучения фармакокинетики известного лекарственного препарата не только на животных, но и на человеке.

На примере карбамазепина, относящегося к лекарственным противосудорожным средствам, настоящими исследованиями показан алгоритм использования фармакокинетических параметров при построении модели прогноза токсичности при экстраполяции данных с животных применительно к человеку.

Цель исследования – оценить результаты теоретических и экспериментальных исследований по разработке адекватных моделей прогноза токсичности ксенобиотиков применительно к человеку и разработать принципы, лежащие в основе новых методов прогноза с использованием данных фармако-, токсикокинетики.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Апробацию разработанных методов прогноза токсичности ксенобиотиков проводили с использованием значений токсикометрических параметров для соединений различных классов и данных по их содержанию в плазме крови при пероральном пути поступления в организм человека, найденным по справочным литературным данным. Концентрацию веществ в плазме крови определяли методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, газовой хроматографии, в отдельных случаях с использованием хроматомасс-спектрометрии. Сформированная база данных включает информацию о токсичности и фармакокинетики более чем для 200 различных соединений.

Величины токсичности и значения концентрации карбамазепина в плазме крови для человека использовали по литературным данным [13, 14].

В исследованиях по изучению фармакокинетики карбамазепина у животных использовали пероральный способ введения. Карбамазепин разводили в 1% водном растворе крахмала в количестве 10 мл/кг. Концентрацию карбамазепина определяли в плазме крови различных видов лабораторных животных. Кровь у крыс и хомяков отбирали из подъязычной вены, у мышей и морских свинок - путем декапитации через 1, 2, 4, 7 часов после введения препарата. На каждый срок обследовали по 6 животных.

Для определения карбамазепина в чистые пробирки отбирали по 1 мл плазмы и подкисляли добавлением 50 мкл 6М HCl. Затем, небольшими порциями в течение 30 с приливали 8 мл хлороформа. После чего добавляли 60 мг аммония сернокислого. Каждое

добавление реактивов сопровождалось интенсивным перемешиванием проб. Полученные после описанных операций пробы центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. Затем 6 мл супернатанта отбирали в чистые пробирки и выпаривали потоком воздуха до сухого остатка при 42 °С. После чего в пробирки добавляли по 100 мкл метилового спирта, встряхивали в течение 30 с и проводили хроматографический анализ полученного смыва.

Оптимизацию параметров хроматографического разделения карбамазепина проводили в условиях жидкостной обращенно-фазовой хроматографии с использованием колонок Zorbax SB-C18 (4,6 × 250 mm, 5µm) на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent HP 1100 фирмы Hewlett Packard (США). Идентификацию карбамазепина осуществляли при $\lambda = 290$ нм и подвижной фазы метанол-вода в соотношении 70 : 30 объемных единиц. Скорость потока подвижной фазы составила 1 мл/мин.

Математическую обработку результатов по расчету интегральных модельно-независимых фармакокинетических параметров производили с использованием метода статистических моментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С позиций современных знаний о механизмах взаимодействия ксенобиотика с организмом токсическое действие вещества в большей степени определяется его концентрацией в районе биологической мишени, что в значительной мере связано с его биодоступностью. Биодоступность вещества зависит от многих факторов и, прежде всего, от скорости преодоления химическим агентом разнообразных тканевых и клеточных барьеров, при которой достигается необходимая концентрация вещества в органе-мишени, где осуществляется соответствующий токсический эффект. Скорость преодоления веществом различных барьеров зависит от физико-химических свойств самого химического агента (способности к ионизации, диссоциации, растворению в липидах, связыванию с белками плазмы крови, белками межклеточного пространства, с белками внутри клетки и т. п.). После распределения вещества в органах и тканях устанавливается равновесие между концентрацией ксенобиотика в крови и органах, в том числе, и в органе-мишени. При этом концентрация вещества в месте действия является функцией от концентрации вещества в крови [13, 14, 15]. Следовательно и эффект является функцией от концентрации вещества в крови.

На основании вышеизложенного, в ряде работ описывается возможность установления характера зависимости между токсическим эффектом и концентрацией

ксенобиотика в организме [15, 16, 17]. Авторы выделяют три варианта кинетики токсического эффекта:

- эффект нарастает и убывает пропорционально концентрации яда в крови (например, отравление оксидом углерода);
- эффект снижается, несмотря на сохранение высокого уровня концентрации вещества в крови (некоторые раздражающие газы);
- развитие эффекта отстает от нарастания концентрации яда в крови и проявляется после определенного латентного периода (алкилирующие агенты).

Из этого следует, что токсикодинамическая фаза отравления является достаточно растянутой. Она охватывает не только первичную реакцию организма, связанную с нарушением функции мембран, ферментов, рецепторов и других биомишеней, но и все последующие этапы формирования патологического состояния: пусковой механизм → появление начальных симптомов → стресс-реакция → формирование типового патологического процесса → экстремальное состояние → смерть.

Практическим воплощением существующего положения о тесной связи фармакодинамических и фармакокинетических процессов явились работы, посвященные исследованию динамики эффекта, вызываемого тем или иным лекарственным веществом (ЛВ) и его кинетикой в плазме крови [15 – 18].

Для значительного числа ЛВ обнаруживается достаточно высокая линейная корреляция между величиной наблюдаемого фармакологического эффекта и его уровнем в плазме крови, то есть имеет зависимость вида [16]:

$$E = a \cdot C_p + b, \quad (1)$$

где E - эффект;

C_p - концентрация ЛВ в плазме;

a, b – коэффициенты регрессии.

Данную модель использовали R. Myerburg с соавторами для новокаинамида [19]. В качестве эффекта в ответ на введение новокаинамида выбрали количество экстрасистол за 30 мин. Эффект хорошо коррелировал с концентрацией препарата в плазме крови: коэффициент корреляции был равен 0,81 для больных с инфарктом миокарда и 0,92 для больных с ишемической болезнью сердца.

S. Bryson и соавторы изучили удлинение интервала QT на ЭКГ в ответ на введение дизопирамида [20]. Было показано, что в случае перорального приема значение эффекта (QT)

пропорционально концентрации дизопирамида в плазме в течение всего времени после приема ЛВ, а в случае внутривенного введения - после установления квазистационарного состояния - примерно через 20 мин после введения ($r = 0,92$).

Согласно уравнению (1) допустимо бесконечное и достаточно быстрое возрастание эффекта при росте концентрации ЛВ в крови. В действительности же величина эффекта, как правило, ограничена некоторым физиологическим пределом. Поэтому было предложено использовать логарифмическую зависимость [21]:

$$E = a \cdot \lg C_p + b. \quad (2)$$

В данном случае эффект (E) также монотонно возрастает с ростом концентрации (C_p). Однако рост эффекта происходит значительно медленнее, и этого часто оказывается достаточно, чтобы избежать противоречий в длительном интервале изменения концентрации вещества.

При исследовании большого диапазона концентрации вещества кривая «концентрация-эффект» имеет S-образный вид. Простейшая модель, описывающая «насыщение» эффекта, основана на уравнении гиперболы (изотерма абсорбции Ленгмюра):

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C_p}{C_{p,50} + C_p}, \quad (3)$$

где E – эффект;

C_p – концентрация вещества в плазме;

$E_{\max}$ - максимальный эффект, возможный для данного вещества;

$C_{p,50}$ - концентрация, необходимая для достижения эффекта, равного 50 % от $E_{\max}$.

Аналогичное уравнение широко используется в ферментативной кинетике (например, уравнение Михаэлиса-Ментен) и при анализе связывания с белками (уравнение Скатчарда). Применение этого уравнения при анализе фармакологического эффекта также обосновано теоретически, исходя из предпосылки об усилении эффекта по мере насыщения рецепторов молекулами ЛВ в соответствии с теорией Ariens.

Аналогичное отношение используется для описания нелинейной фармакокинетики [22]:

$$v = V_{\max} \cdot C_p / (K_m + C_p), \quad (4)$$

где v – скорость элиминации ЛВ;

$V_{\max}$ - максимальная скорость элиминации ЛВ;

K_m – константа сродства (константа Михаэлиса);

C_p – концентрация ЛВ в сыворотке крови.

В некоторых работах скорость элиминации вещества (v) определяют как скорость дозирования лекарственного вещества (DR – величина суточной дозы) [23].

Из вышесказанного следует, что концентрация ЛВ в плазме крови имеет связь с воздействующей на организм дозой вещества и соответствующим токсическим эффектом. Чем больше величина дозы вещества, воздействующего на организм, тем выше его концентрация в плазме крови и проявление эффекта более выражено (до определенного предела). Однако и эта связь не всегда является прямой и однозначной, поскольку ферментные и транспортные системы организма постоянно участвуют в процессах детоксикации вещества и непосредственное воздействие на чувствительные к нему рецепторы оказывает только та часть вещества, которая их достигает. Данное обстоятельство объясняет тесную и неразрывную связь между токсикодинамикой вещества и его токсикокинетикой. Кроме того, описанные выше механизмы являются наследственно обусловленными, что определяет их индивидуальную чувствительность к «химическому» воздействию на организм.

Учитывая всю сложность описания процессов, связанных с воздействием вещества на организм, моделирование токсикокинетики, а также поиск и анализ связи экспериментальных данных с токсоеффектом, на современном этапе признается перспективным направлением - исследования по использованию параметров кинетики вещества в организме при разработке новых способов прогноза токсичности различных физиологически активных веществ (ФАВ). Используя современные приемы моделирования в токсикологии и в области фармако-, токсикокинетики мы предлагаем новую методологию прогноза токсичности ксенобиотиков применительно к человеку по данным основанным на кинетике вещества в организме. Разработанный алгоритм использования экспериментальных данных направлен на уменьшение прогнозных ошибок, характеризующих токсичность ксенобиотика (рисунок 1). Методология прогноза токсичности ксенобиотиков применительно к человеку основана на принципах, лежащих в основе использования фармако-, токсикокинетики в целях прогноза токсичности ксенобиотиков применительно к человеку, относительно самых разнообразных классов соединений. Основные принципы предлагаемой методологии заключаются в изучении фармакокинетики фармзонда и исследуемого вещества для различных видов биообъектов с использованием основных приемов моделирования фармакокинетических функций, привлечения кластерного и

регрессионного методов анализа, разработке и оптимизации высокочувствительных аналитических способов при идентификации исследуемых ксенобиотиков в биосредах.

Предложенный способ оценки токсичности веществ при экстраполяции данных, полученных на животных, применительно к человеку, имеет преимущество по сравнению с существующими способами, который заключается в повышении точности исследований за счет использования данных фармакокинетики фармзонда (лекарственного препарата) для человека в исследованиях *in vivo*. Использование разработанных моделей позволяет рассчитать величины LD_{50} применительно к человеку с ошибкой предсказания, не превышающей в большинстве случаев от 2 до 3 раз.

Идея «метаболического маркера» реализуема в случае, если метаболизм исследуемого ксенобиотика предполагает общность метаболических путей с фармзондом. В этом случае можно выбрать лекарственное вещество (фармакологический зонд) и по скорости его окисления охарактеризовать активность окислительных ферментов организма в отношении многих или нескольких окисляющихся ксенобиотиков. На роль таких «маркеров-зондов» чаще других использовали в клинической практике антипирин [16, 24] и дебризохин [25] для определения терапевтических доз лекарственных препаратов в стационарных условиях лечения при различной патологии печени [26].

Коренным отличием от ранее построенных моделей, оценивающих токсичность вещества с использованием данных фармакокинетики, является то, что компартмент

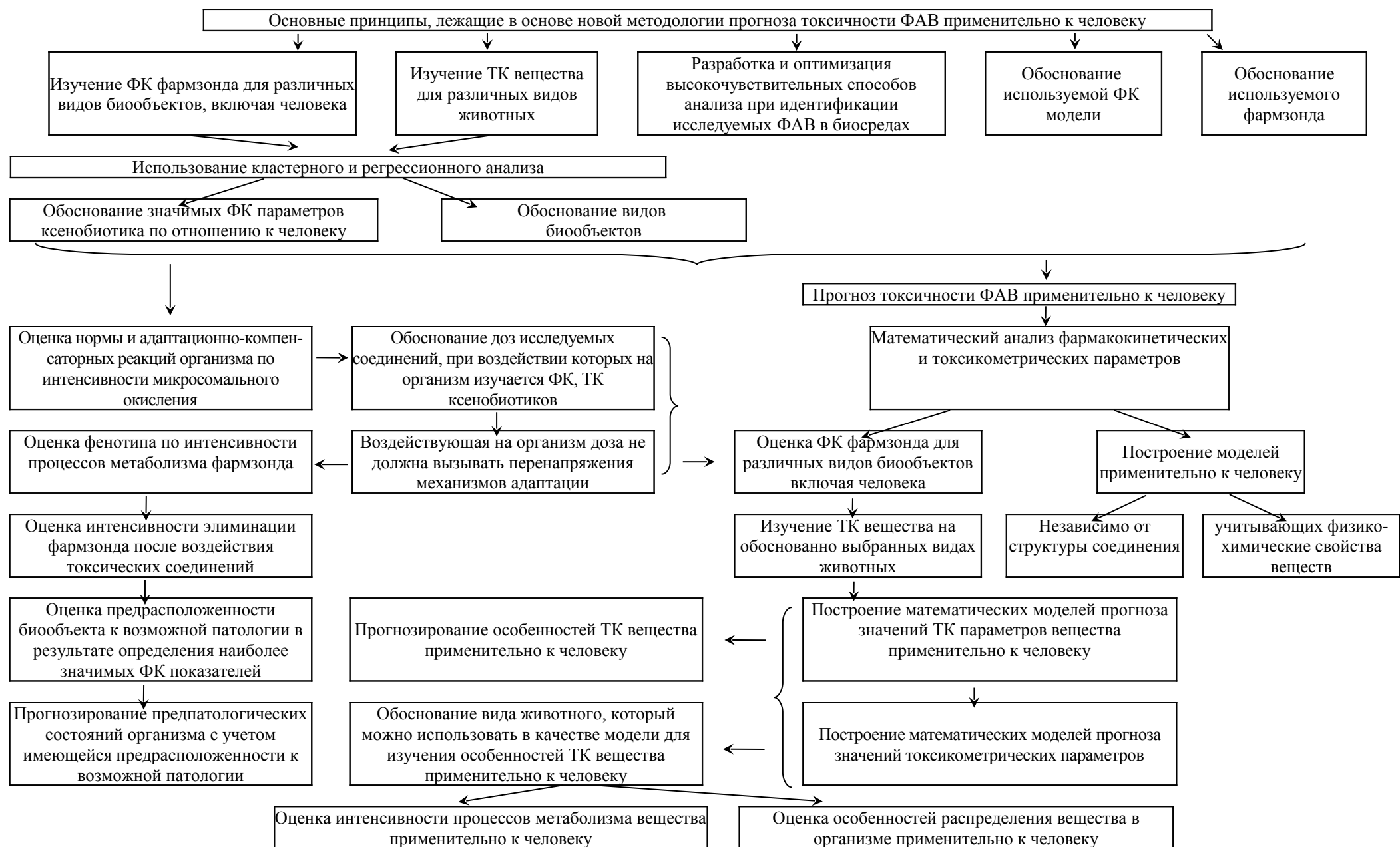


Рисунок 1 – Основные принципы методологии прогноза токсичности физиологически активных веществ (ФАВ) применительно к человеку по данным фармако- (FK) и токсикокинетики (ТК)

фармакодинамического эффекта (моделируемая камера, где происходит исследование того или иного эффекта) не влияет на особенности фармакокинетики вещества. То есть, параметры фармакокинетики и фармакодинамики вещества определяются в разных моделируемых камерах [27].

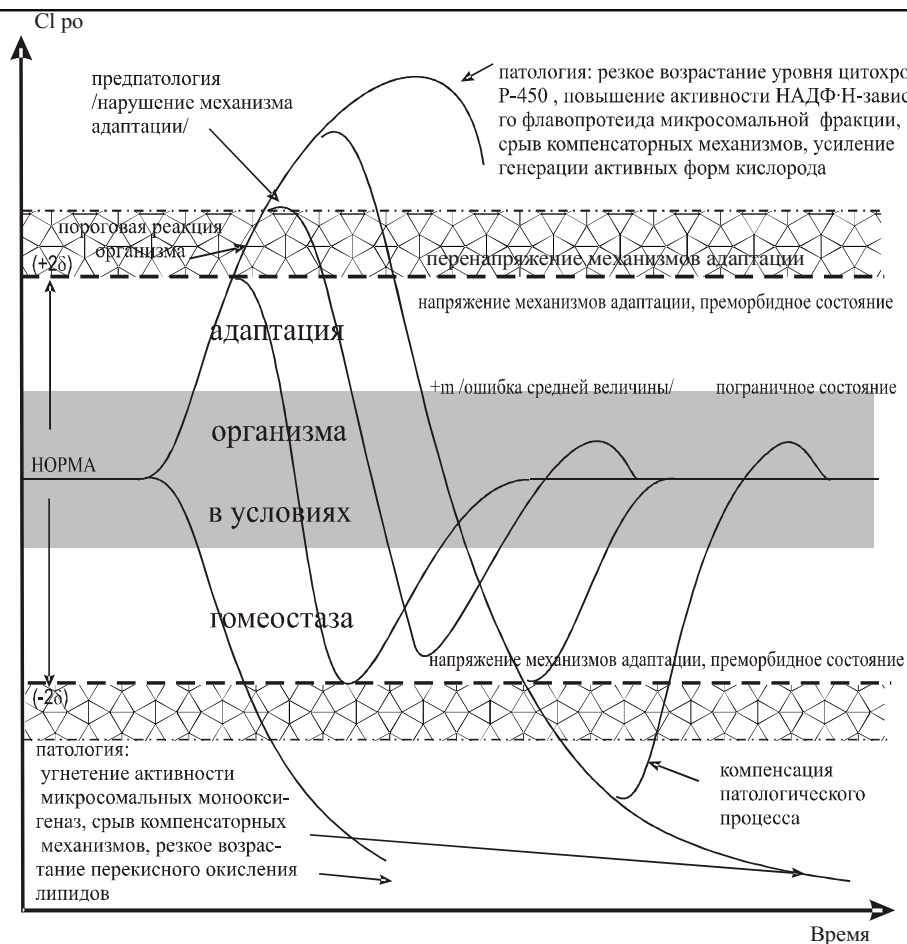
В настоящее время расчет фармакокинетических параметров ЛВ производят, в большинстве случаев, с использованием математических программ, которые включают основные приемы моделирования фармакокинетических функций. Однако необходимо помнить, что точность результатов расчета фармако-, токсикокинетических параметров во многом зависит от использования тех или иных приемов моделирования, обоснование которых должно быть согласовано с целью и задачами проведения конкретных исследований.

В данном случае, использование способа моделирования фармакокинетики, основанного на использовании частевых (камерных, компартментальных) моделей представления кинетики вещества в отдельной камере (кровь, отдельные системы органов), нецелесообразно, так как уровень допущений при описании кинетики вещества достаточно высок - постулируется определенная структура модели, изолированная от организма. Наиболее общее описание поведения вещества в организме выполняется в рамках так называемого системного подхода, согласно которому организм рассматривается как открытая система, внутренняя структура которой не конкретизируется (детальная картина распределения и выведения вещества). Количественная характеристика основных фармакокинетических процессов оценивается с помощью интегральных параметров (в частности, MRT – среднее время удержания вещества в организме), относящихся к организму в целом, и не зависящих от типа и структуры модели [28, 29, 30, 31]. Преимуществом данного метода оценки токсикокинетики вещества перед остальными является то, что концентрационный профиль соединения в крови наиболее полно оценивается методом наименьших квадратов по значениям времени и логарифмов соответствующих концентраций вещества. Выходной сигнал – это отклик системы на введение ксенобиотика, который может быть количественно измерен как функция времени. Скорость изменения количества вещества в организме определяется разностью скоростей его поступления и выведения.

Методы моделирования фармако-, токсикокинетики ксенобиотиков, описанные выше, основаны на теории линейности. Токсикокинетическая модель называется линейной, если все формализуемые ею процессы описываются кинетическими уравнениями первого порядка, то есть соблюдается условие пропорциональности: скорость изменения концентрации вещества в тест-ткани пропорциональна его концентрации.

Принцип линейности, используемый в новом способе прогноза токсичности ксенобиотиков применительно к человеку с использованием фармако-, токсикокинетики основан на возможности сравнительного анализа кинетических процессов, если биодоступность вещества для различных видов млекопитающих будет оценена в условиях одного и того же состояния организма. Определить такое состояние можно, например, при воздействии на организм дозы вещества, не вызывающей

перенапряжения механизмов адаптации, то есть в условиях нормы (рисунок 2) [32]. Способ оценки нормы с использованием фармакокинетики необходим для решения нескольких задач. С одной



Примечания:

1. - контрольные значения клиренса и его стандартная ошибка ($M \pm m$).
2. - граница стандартного отклонения ($\pm 2\delta$).
3. - величина стандартной ошибки клиренса при пороговой реакции организма.

Норма – динамическое самосохранение организма в различных условиях существования, имеющее в основе закрепленный генотип, проявляющийся фенотипически, посредством изменения значений фармакокинетических параметров, не выходящих за пределы колебаний более чем на 2δ .

Пограничное состояние (в пределах исследуемой выборки) оценивается в зоне величин среднестатистической ошибки (m) показателя нормы.

Состояние напряжения оценивается значениями фармакокинетических показателей, лежащих в диапазоне величин, размеры которых определяются зоной значений, вышедших за среднестатистическую ошибку показателя нормы и ограничивающихся величиной 2δ .

Состояние перенапряжения находится в зоне значений фармакокинетических параметров, вышедших за границу 2δ .

Порог вредного действия характеризуется изменением величин фармакокинетических параметров, значения которых выходят за пределы колебаний более чем на 2δ и ограничиваются областью колебаний величин среднестатистической ошибки (m) от границы 2δ .

Рисунок 2 – Адаптационно-компенсаторные реакции, в условиях нормы, напряжения и истощения механизмов адаптации, исследуемые с позиции фармако-, токсикокинетики ксенобиотика, воздействующего на организм

стороны, для оценки индивидуальных различий в чувствительности биообъектов к токсическим агентам, что является чрезвычайно важным для обоснования критериев, связанных с донозологической диагностикой интоксикаций и заболеваний профессионального характера. Такие методы позволяют более точно прогнозировать риск перехода преморбидных состояний организма в патологические [33]. С другой стороны, они необходимы для проведения исследований с интерпретацией данных по биохимическим и фармакокинетическим параметрам, используемым при разработке ряда методов прогноза токсичности ксенобиотиков применительно к человеку [28].

Используя данный принцип, нами разработан новый алгоритм построения зависимостей между фармако-, токсикокинетическими параметрами и величиной токсического эффекта (LD_{50}), который заключается:

- в определяющей роли функции $C(t)$ или ее производной C_{max} (максимальной концентрации вещества в крови) в формировании биологического отклика (например, LD_{50}) при допущении, что существование такой связи не определяется конкретной химической структурой вещества, и она носит достаточно общий характер. C_{max} и другие фармако-, токсикокинетические параметры оценивают при воздействии на организм дозы вещества, обеспечивающей уровень физиологической нормы (граница реакции удовлетворительной и неудовлетворительной адаптации). Уровень нормы для воздействующей на организм дозы вещества определяется на линейном участке в координатах AUC/D от D ;

- в предварительной оценке фармакокинетики фармзонда в равноэффективных дозах, не приводящих к срыву адаптационных возможностей организма различных видов биообъектов, включая человека. Обоснование использования соединений, схожих по фармакокинетическим свойствам и особенностям метаболизма с исследуемым веществом, с учетом его структуры и физико-химических свойств позволяет строить модели для нескольких соединений одного класса, либо модели прогноза токсичности ксенобиотиков для нескольких классов. Использование таких моделей возможно для экспресс-оценки токсичности веществ и определения опасности вещества с минимальными экономическими затратами;

- в изучении токсикокинетики исследуемого вещества на видах животных, обоснованно выбранных по отношению к человеку с использованием кластерного анализа. Привлечение кластерного анализа по выявлению особенностей токсикокинетики вещества позволяет оценить интенсивность процессов, связанных с метаболизмом вещества и его особенностями распределения в организме применительно к человеку;

- в построении математических моделей для прогнозирования значений

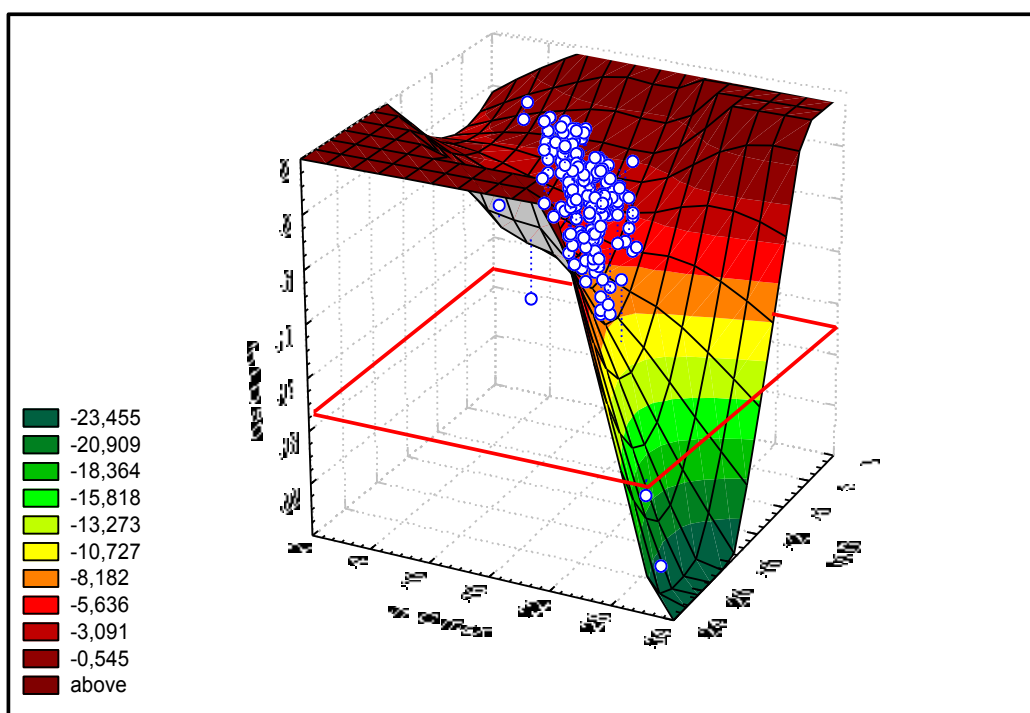
токсикокинетических параметров вещества применительно к человеку (первый этап) и для оценки значений доз различных категорий применительно к человеку (второй этап) с использованием регрессионного анализа.

Пример модели прогноза токсичности ксенобиотиков различных классов (модель включает более 20 классов различных соединений), при их пероральном поступлении в организм человека в зависимости от значений $C_{\max}$ представлен регрессионным уравнением вида:

$$\ln LD_{50} = 3,243(\pm 0,473) + 0,599(\pm 0,033) \ln C_{\max} , \quad (5)$$

$n = 188$; $r = 0,80$; $F = 336,91$ при $p < 0,00001$; станд. ошибка оценки равна 1,71.

Трехмерное графическое изображение модели представлено на рисунке 3.



Примечания:

1. $C_{\max}$ – максимальная концентрация ксенобиотика в крови человека. Значения $C_{\max}$ оцениваются при однократном пероральном воздействии на организм человека дозы (D) ксенобиотика, обеспечивающего уровень физиологической нормы. Значения $C_{\max}$ и D определены по данным литературы.

2. Значения воздействующей на организм дозы (D) токсичных химикатов ограничены пороговой и минимально токсической дозами.

3. Значения LD_{50} определены по справочным материалам несчастных случаев.

4. Секущая плоскость – результат кластерного анализа, ограничивающая данные по лекарственным препаратам от токсичных химикатов.

Рисунок 3 – Графическая поверхность зависимости LD_{50} от C_{max} и D

Максимальные отклонения наблюдаемых значений среднесмертельных доз от соответствующих прогнозных величин отличаются для 90 % соединений в 2,5 раза, однако, для 10 % ксенобиотиков эта величина составляет десятикратное различие. Тем не менее, построение модели, включающей такое большое количество веществ различных по физико-химическим свойствам, показывает достаточно хорошие прогнозные характеристики и подтверждает правильность высказанной гипотезы о возможности построения зависимости фармако-, токсикокинетических параметров от токсикометрических для различных ксенобиотиков.

Поэтому же принципу построены модели прогноза токсикометрических параметров применительно к человеку при пероральном их введении в организм, с учетом класса соединений (таблица 1). Результаты расчетов подтвердили наличие достоверной связи между значениями LD_{50} и токсикокинетическими показателями исследуемых ФАВ.

Математический (регрессионный) анализ прогноза токсичности в зависимости от фармакокинетических параметров по классам соединений показывает значимые модели, характеризующиеся высокими коэффициентами корреляции и Фишера. Прогнозируемая величина LD_{50} для отдельных соединений не превышает 2,8 раз.

Необходимо отметить, что для трех классов соединений: производные барбитуровой кислоты, производные хинолина и замещенные азотсодержащие гетероциклы независимыми переменными являются одни и те же фармакокинетические параметры (V_z и $1/C_{max}$). Очевидно, эти классы соединений характеризуются общими кинетическими свойствами. Поэтому данные соединения могут быть объединены в одну модель прогноза токсичности ксенобиотиков для человека.

Одним из принципов, улучшающим зависимость токсикокинетических параметров с токсичностью ксенобиотиков, является анализ тесноты количественной корреляции токсикокинетических параметров, связанных с массой тела и скоростью метаболизма ксенобиотика в организме. Проведение подобных исследований является необходимым, так как использование многочисленных видов животных, различающихся по массе тела в десятки, сотни и тысячи раз, по отношению к человеку, а также имеющиеся особенности обменных и метаболических процессов, требуют особого внимания к обоснованию видов и оптимальных биохимических параметров для экстраполяции токсичности ФАВ применительно к человеку. В связи с вышеизложенным, предлагается использовать

кластерный анализ по выявлению общности обменных и метаболических процессов по отношению к человеку.

Таблица 1.

Анализ зависимостей смертельных доз ксенобиотиков для человека при пероральном поступлении ксенобиотика в организм относительно токсикокинетических параметров, построенных с учетом класса соединений

№ п/п	Регрессионное уравнение	Класс соединений	ФАВ	Наблюда- емая (по данным литерату- ры) LD ₅₀ , мг/кг	Прогнози- руемая LD ₅₀ , мг/кг	$\frac{LD_{50 \text{ набл.}}}{LD_{50 \text{ прогн.}}}$	n	r	r ²	F	Станд. ошибка оценки
1	$1/LD_{50} = -0,020 (\pm 0,006) + 0,00052 (\pm 0,00012) V_z + 0,050 (\pm 0,019) 1/C_{\max}$, r между V_z и $1/C_{\max}$ равен 0,55	Производные барбитуровой кислоты	Апробарбитал Барбитал Бутабарбитал Метиприлон Пентобарбитал Секобарбитал	72,857 85,710 112,000 198,570 142,000 15,714	151,492 98,649 109,914 71,286 130,685 15,995	0,481 0,869 1,019 2,786 1,086 0,982	6	0,973	0,946	26,275 p<0,012	0,007
2	$1/LD_{50} = 0,0075 (\pm 0,0059) - 0,000016 (\pm 0,000005) V_z + 0,0049 (\pm 0,0013) 1/C_{\max}$, r между V_z и $1/C_{\max}$ равен 0,51	Производные хинолина	Гидроксихлороквин Номифензин Папаверин Квинин Метаквалон	180,000 21,429 100,000 85,714 142,857	255,785 23,175 51,730 174,642 121,183	0,704 0,925 1,933 0,491 1,179	5	0,940	0,884	7,615 p<0,116	0,008
3	$1/LD_{50} = 0,0025 (\pm 0,0059) + 0,000082 (\pm 0,000014) V_z + 0,00270 (\pm 0,00018) 1/C_{\max}$, r между V_z и $1/C_{\max}$ равен 0,43	Замещенные азотсодержа- щие гетероциклы	Бромфенирамин Гидроксизин Изониазид Метсуксимид Фенилбутазон	4,500 8,929 200,000 142,850 114,286	4,496 9,034 83,689 87,108 272,926	1,001 0,988 2,389 1,639 0,420	5	0,998	0,995	203,85 p<0,005	0,009

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В качестве примера, иллюстрирующего использование фармакокинетических параметров при построении модели прогноза токсичности при экстраполяции данных с животных применительно к человеку, предоставляем экспериментальные данные фармакокинетики трициклического ГАМК-миметика – карбамазепина, относящегося к лекарственным противосудорожным средствам и выступающего в роли фармакологического зонда. Основной путь метаболизма карбамазепина – эпоксидирование в микросомах эндоплазматического ретикулума [34].

Кластерный анализ проводили с использованием результатов исследований по элиминации и токсичности карбамазепина, полученных для различных видов и линий животных, а также для человека (таблица 2). При проведении кластерного анализа данных, полученных для всех исследуемых видов животных по отношению к человеку с учетом параметров AUC , MRT_{po} , V_z , выявили только 2 кластера, причем значения исследуемых величин для человека выделяются в отдельный кластер при первой же интеграции (таблица 3). Анализ данных таблицы 3 свидетельствует о значительных различиях в величинах представленных параметров, отличающихся между кластерами на порядок. Данный факт еще раз подтверждает результаты исследований Инга и Дэтрика о связи указанных параметров с весом и поверхностью тела.

При аналогичном анализе соответствующих видов и линий биообъектов для таких фармакокинетических параметров, как Cl , k_{el} , C_{max} выделяют семь кластеров, в последний из которых объединяются человек и нелинейные крысы среднего и медленного типа метаболизма (таблица 4).

Для значений k_{el} при кластеризации последней итерацией становится седьмой кластер, в который объединены человек, морская свинка, крысы линии Wag. При аналогичной кластеризации значений Cl_{po} (л/г) в один кластер объединяются человек и хомяк. Ни одна из исследуемых линий мышей при кластеризации фармакокинетических параметров не объединяются в одну группу с человеком.

По результатам кластерного анализа следует, что при построении модели экстраполяции значений токсичности карбамазепина предпочтительнее использовать следующие виды и линии биообъектов: нелинейная мышь, хомяк, морская свинка, белая нелинейная крыса (средний тип метаболизма), крыса линии Wag.

В таблице 5 представлены наиболее значимые модели оценки токсичности карбамазепина применительно к человеку. Модели описаны функцией $1/LD_{99} = a + b \cdot x$, причем параметр V_z , связанный с массой тела, представлен прямой зависимостью, а k_{el} , отражающая скорость кинетических процессов элиминации, - обратной ($1/k_{el}$).

Таблица 2.

Фармакокинетические и токсикометрические параметры карбамазепина при его пероральном введении различным видам и линиям биообъектов

Виды и линии биообъектов	Количество биообъектов	Фармакокинетические параметры, $\bar{x} \pm S \bar{x}$								D, мг/кг	LD ₅₀ , мг/кг
		AUC, мкг·ч/мл	AUC/D, ч/мл	C _{max} , мкг/мл	k _{el} , 1/ч	MRT _{po} , ч	Cl _{po} , л/ч	V _z , л	Cl, л/кг·ч		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Мышь:											
F ₁ (C ₅₇ Bl ₆ ·CBA)	24	4,94	24,70	1,85	0,43	3,38	0,041	0,093	2,03	10	-
F ₁ (C ₅₇ Bl ₆ ·DBA)	24	4,80	24,00	2,20	1,08	1,65	0,042	0,039	2,08	10	-
DBA/2	24	1,90	9,50	1,00	1,02	1,60	0,108	0,106	5,40	10	-
CBA/lac	24	12,52	41,73	2,75	0,62	2,84	0,024	0,039	1,20	15	-
BalB/C	24	7,26	18,15	4,01	0,87	1,73	2,753	3,151	137,65	20	-
нелинейная	24	7,42±1,75	37,1	1,40±0,03	0,16±0,04	7,29±1,58	0,031±0,008	0,192±0,004	1,54	10	1100,0
нелинейная	24	6,14	20,47	4,10	0,99	1,49	0,049	0,050	2,45	15	1100,0
Хомяк	6	3,10±0,86	1,55	1,40±0,40	1,12±0,11	2,25±0,20	1,299±0,610	1,227±0,630	12,99	20	1000,0
Морская свинка	24	23,50	2,94	2,90	0,15	7,07	0,340	2,299	0,85	20	920,0
Линейная крыса:											
Wistar	6	7,10±1,18	1,78	2,00±0,25	0,50±0,15	3,48±0,67	0,640±0,090	1,639±0,300	3,20	20	-
August	6	9,11±2,72	2,28	2,73±0,44	0,50±0,09	3,23±0,90	0,630±0,160	1,362±0,317	1,58	20	-
Fisher	11	14,23±3,82	3,56	3,42±0,62	0,44±0,12	4,33±0,76	0,518±0,120	1,686±0,478	2,59	20	-
Wag	6	35,59±8,56	8,90	3,76±0,60	0,12±0,02	9,47±1,47	0,165±0,056	1,217±0,253	0,82	20	-

Продолжение таблицы 2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
нелинейная крыса	24	43,23±8,49	10,81	5,29±0,80	0,31±0,09	9,82±2,94	0,121±0,023	0,810±0,252	0,60	20	3850,0
нелинейная крыса (средний тип метаболизма)	16	38,47±2,08	7,69	7,16±0,88	0,32±0,06	6,72±1,07	0,155±0,019	0,699±0,133	0,78	25	3850,0
Нелинейная крыса (быстрый тип метаболизма)	28	20,32±1,66	4,06	3,63±0,26	0,24±0,02	6,08±0,04	0,308±0,032	1,473±0,176	1,54	25	-
нелинейная крыса (медленный тип метаболизма)	23	101,38±11,96	20,28	6,88±0,43	0,10±0,01	15,94±2,41	0,061±0,005	0,702±0,069	0,31	25	-
Человек**)	6	619,79	0,77	9,20	0,02	61,27	1,291	71,560	0,02	12	116,0*)

Примечания:

1. *) - По данным случайных отравлений [Bozza-Marrubini M.L., Ghezzi R., Ucelli P. Intossicazioni Acute.- 2e ed. Org. Editoriale Medico Farmaceutica.- Milano, 1987; Groot G., Heijst A.N.P., Maes R.A.A. Charcoal Haemoperfusion in the treatment of two cases of acute carbamazepine poisoning// Journal of Toxicology and Clinical Toxicology .- 1984.- № 22.- P. 349-362.].

2. **) - Величины фармакокинетических параметров использовались по литературным данным [Levy R. H., Pitlick W.H., Troupin A.S. Pharmacokinetics of carbamazepine in normal man // Clin. Pharm Ther.- 1975.- Vol. 17.- P. 657-668].

3. D – значения доз, при которых определялись фармакокинетические параметры.

4. $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ - данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего.

Таблица 3.

Результаты кластерного анализа исследуемых видов биообъектов по отношению к AUC, MRT_{po}, V_z карбамазепина при его пероральном введении

Виды биообъектов	Номер кластера	Параметр	Среднее значение параметра внутри кластера и его стандартная ошибка, $\bar{x} \pm S \bar{x}$
Человек	1	AUC	619,79
		MRT _{po}	61,27
		V _z	71,56
Все остальные исследуемые виды и линии животных	2	AUC	20,85±25,23
		MRT _{po}	5,07±3,98
		V _z	1,037±0,900

Таблица 4.

Результаты кластерного анализа исследуемых видов биообъектов при седьмой итерации по отношению к Cl, k_{el}, C_{max} карбамазепина при его пероральном введении

Номер кластера	Виды, линии биообъектов	Анализируемый параметр	Среднее значение параметра внутри кластера и его стандартная ошибка, $\bar{x} \pm S \bar{x}$
1	2	3	4
1	Нелинейная мышь, крыса линии Fisher	C _{max}	3,760±0,481
		k _{el}	0,713±0,385
		Cl	2,518±0,103
2	Мышь линии CBA/lac, морская свинка, крыса линии August, крыса линии Wag, нелинейная крыса с быстрым типом метаболизма	C _{max}	3,152±0,498
		k _{el}	0,326±0,223
		Cl	1,198±0,361
3	Мышь линии: F ₁ (C ₅₇ Bl ₆ ×CBA), F ₁ (C ₅₇ Bl ₆ ×DBA); крыса линии Wistar	C _{max}	2,017±0,176
		k _{el}	0,671±0,355
		Cl	2,435±0,663
4	Мышь линии DBA/2	C _{max}	1,00
		k _{el}	1,02
		Cl	5,40
5	Хомяк	C _{max}	1,40
		k _{el}	1,12
		Cl	12,99
6	Нелинейная крыса	C _{max}	5,29
		k _{el}	0,31
		Cl	0,63
7	Нелинейная крыса: медленный тип метаболизма, средний тип метаболизма; человек	C _{max}	7,747±1,266
		k _{el}	0,148±0,158
		Cl	0,367±0,382

Таблица 5.

Анализ связи смертельных доз и фармакокинетических параметров карбамазепина при его пероральном введении по данным исследований полученных на животных и человеке

№ п/п	Уравнение регрессии	n	r	r ²	F	станд. ошибка оценки	LD ₉₉ , мг/кг (по данным случайных отравлений с неблагоприятным исходом)	Прогнозируемая LD ₉₉ для человека, мг/кг
1	1/LD ₉₉ = 0,00069(±0,00017)+0,000111(±0,000005) V _z	5	0,997	0,997	421,7 p<0,0003	0,00034	116,0	115,96
2	1/LD ₉₉ = 0,00019 (±0,00026)+0,00015 (±0,00001) 1 / k _{el}	5	0,993	0,986	213,9 p<0,0007	0,00048	116,0	116,67
3	1/LD ₉₉ = 0,00014 (± 0,00037)+0,00014 (±0,00001) MRT _{po}	5	0,990	0,981	151,5 p<0,0012	0,0056	116,0	116,75
4	1/LD ₉₉ = 0,00059 (±0,00028) + 0,00013 (±0,000001) AUC	5	0,991	0,982	159,36 p<0,0011	0,00055	116,0	116,54
5	1/LD ₉₉ = 0,00063(±0,00031)+0,00013 (±0,00005) k _{el} + +0,000112 (±0,000007) V _z	5	0,997	0,993	144,9 p<0,0069	0,00041	116,0	115,96
6	1/LD ₉₉ = 0,00021 (±0,00026)+0,000116 (±0,000004) V _z + +0,0010 (± 0,0005) 1/C _{max}	5	0,999	0,998	465,45 p<0,0021	0,00023	116,0	115,92

Примечание – Коэффициенты корреляции между значениями: V_z и 1/C_{max} = 0,56; k_{el} и V_z = 0,42; 1/LD₉₉ и 1/C_{max} = 0,50.

Двухпараметрические модели представлены такими независимыми переменными, как V_z , $1/C_{\max}$ и $1/k_{el}$, что свидетельствует о существующем вкладе в величину токсичности лекарственного вещества не только фармакокинетических параметров, отражающих связь с обменными процессами, массой тела, но и метаболическими процессами, связанными с элиминацией соединения. На основании полученных результатов с использованием кластерного и регрессионного методов анализа рассчитана модель прогноза токсикометрических параметров для карбамазепина при экстраполяции экспериментальных данных с животных применительно к человеку с достаточно низкой ошибкой.

Таким образом, предлагаемый способ прогноза вероятной токсичности ксенобиотиков применительно к человеку имеет преимущество по сравнению с существующими методами в повышении точности и экспрессности исследований за счет использования фармакокинетических параметров в моделях, оценивающих токсичность веществ, и в анализе основных причин, влияющих на возникновение ошибок средних прогнозных характеристик при построении адекватных моделей прогноза токсичности химических соединений, включающих, в том числе, известные лекарственные препараты, используемые в качестве фармакологических зондов.

Предлагаемые подходы могут быть применены при токсикометрической оценке веществ, результаты которых могут быть использованы при проведении соответствующих мероприятий по охране здоровья населения в экологически неблагоприятных районах и при оценке возможного вредного действия ксенобиотиков на организм персонала, работающего на объектах по хранению и уничтожению химического оружия, а также при клинических испытаниях новых лекарственных препаратов.

ВЫВОДЫ

1 Сформулированы основные принципы, лежащие в основе новой методологии прогноза токсичности физиологически активных веществ для человека. Предложен принципиально новый способ прогноза вероятной токсичности ксенобиотиков применительно к человеку, который имеет преимущество по сравнению с существующими методами в повышении точности и экспрессности исследований за счет использования фармакокинетических параметров в моделях, оценивающих токсичность веществ.

2 Настоящими исследованиями впервые научно разработан принципиально новый алгоритм использования фармакокинетических параметров при построении модели прогноза токсичности при экстраполяции данных с животных применительно к человеку, заключающийся:

- в предварительной оценке фармакокинетики фармзонда в равноэффективных дозах, не приводящих к срыву адаптационных возможностей организма, различных видов биообъектов включая человека;

- в решении системы уравнений и в привлечении кластерного анализа по выявлению особенностей токсикокинетики вещества применительно к человеку и научном обосновании видов биообъектов, которые можно использовать в качестве моделей по оценке интенсивности процессов, связанных с метаболизмом вещества и его особенностям распределения в организме.

3 Предложены математические модели расчета смертельных доз ФАВ для человека при их пероральном пути поступления в организм. Полученные математические модели прогноза токсичности веществ в зависимости от их фармакокинетических параметров, позволяют строить адекватные модели для определения токсичности других ФАВ применительно к человеку с использованием данных их фармакокинетики.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рыболовлев Ю.Р. Прогнозирование действия ксенобиотиков на человека // Фармакол. и токсикол.- 1984.- № 1.- С. 110-114.
2. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады Академии Наук СССР.- 1979.- Том 247, № 6.- С. 1513-1516.
3. Бойко С.С., Жердев В.П., Пятин Б.М. [и др]. Межвидовые различия фармакокинетики кематана // Эксперим. и клин. фармакол.- 1994.- Том 57, № 6.- С. 48 - 50.
4. Родионов А.П., Игнатова Н.А., Кушнарев В.В. [и др.] Сравнительное изучение фармакокинетики бефола у экспериментальных животных и человека // Фармакол. и токсикол.- 1990.- Том 53, № 2.- С. 62 - 63.
5. Еремин С.К., Б.Н. Изотов Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в химико-токсикологическом анализе лекарственных соединений // Ж. аналитической химии.- 1988.- Том XLIII, Вып. 1.- С. 5-18.
6. Синицин А.Н., Холодов Л.Е. Колебания уровней лекарственных веществ в крови животных и человека после однократного введения // Фармакол. и токсикол.- Том XLVIII, № 1.- 1985.- С. 93-99.
7. Саноцкий И.В. Индивидуальная реактивность и вероятность изменения здоровья человека при химических воздействиях (полемика по принципиальным вопросам) // Медицина труда и пром. экология.- 1993.- № 3-4.-С. 9-12.
8. Ings R.M.J. Interspecies scaling and comparisons in drug development and toxicokinetics // Xenobiotica.- 1990.- Vol. 20, № 11.- P. 1201-1231
9. Detrick R.L., Bishoff K.B. A species similarities in pharmacokinetics // Federation Proc.- 1980.- Vol. 39, № 1.- P. 54-59.
10. Бородюк Н.Р. Способ определения индивидуальной чувствительности к внешним воздействиям.- Заявка на изобретение от 20.11.95 // Изобретения.- 1995.- № 34.- С. 72.
11. Пиотровский В.К. Проблемы и перспективы использования фармакокинетики для индивидуализации лекарственной терапии // В сб.: Актуальные вопр. клин. фарм. (XV конф. по клин. фарм. с междунаро. участ.).- Волгоград: 1990.- С. 47.
12. Холодов Л.Е., Глезер М.Г. Методы индивидуализации и оптимизации применения лекарств на основе их фармакокинетики / Л.Е. Холодов, М.Г. Глезер.- М.- 1992.- Ч. 2.-

С. 35-40.

13. Levy R.H., Pitlick W.H., Troupin A.S. [et al.] Pharmacokinetics of carbamazepine in normal man // Clin. Pharm. Ther.- 1975.- Vol. 17.- P. 657-668.

14. Bozza-Marrubini M.L., Ghezzi R., Ucelli P. Intossicazioni Acute.- 2e ed. Org. Editoriale Medico Farmaceutica.- Milano, 1987.

15. Дорохов В.В., Холодов Л.Е. Анализ связи между фармакокинетическими процессами и фармакологическими эффектом у человека // Фармакол. и токсикол.- 1985.- № 5.- С. 119-125.

16. Холодов Л.Е. Клиническая фармакокинетика / Л.Е. Холодов, В.П. Яковлев.- М.: Медицина, 1985.- 464 с.

17. Соловьев В.Н., Фирсов А.А. Фармакокинетика / В.Н. Соловьев, А.А. Фирсов, В.А. Филов.- М.: Медицина.- 1980.- 423 с.

18. Жердев В.П., Воронина Т.А., Экономов А.П. Корреляция между фармакокинетическими показателями и фармакологическим эффектом феназепама в эксперименте // Фармакол. и токсикол.- 1985.- № 6.- С. 67-70.

19. Myerburg R. J., Kenneth M., Kiem I. [et. al.] // Circulation, 1981.- Vol. 64.- P. 280-290.

20. Bryson S. M., Whiting B., Lawrence J.R.// Brit. J. clin. Pharmacol.- 1978. Vol. 6.- P. 409-419.

21. Levy G.// Clin. Pharmacol. Ther., 1966.- Vol. 7.- P. 362-372.

22. Калви Т.Н., Уильямс Н.Е. Фармакология для анестезиолога / Т.Н. Калви, Н.Е. Уильямс Пер. с англ.- М.: «Издательство БИНОМ», 2007.- 176 с.

23. Мирошниченко И.И. Основы фармакокинетики/ И.И. Мирошниченко.- М.: ГЭОТАР-МЕД, 20002.- 192 с.

24. Викторов А.П., Рыбак А.Т. Использование антипиринового теста при изучении микросомального окисления лекарственных средств// Фармакол. и токсикол.- 1990.- Том 53, № 1.- С. 74-77.

25. Jager E., Hall S.D., Branch R.A. Genetically determined polymorphisms in drug oxidation // Hepatology.- 1986.- № 6.- P. 1032-5100.

26. Бендигов Э.А., Логинов А.С., Петраков А.В. Фармакокинетика и метаболизм антипирина у больных с хроническими поражениями печени / Э.А. Бендигов, А.С. Логинов, А.В. Петраков // В кн.: Методы индивидуализации и оптимизации применения лекарств на основе изучения их фармакокинетики.- М., 1982.- Ч. 2.- С. 116-120.

27. Хоронько В.В. Терапевтический мониторинг (фармакокинетика, как основа терапевтического мониторинга): часть 1 / В.В. Хоронько [и др.]. – Ростов н/Д.: Изд-во РГПУ,

2005. – 44 с.

28. Рембовский В.Р., Антонова О.М. [и др.] Способ определения вероятной токсичности ксенобиотиков применительно к человеку: Патент №2223493.- Заявл. 22.01.2002; Оpubл. 10.02.2004 // Изобретения. Полезные модели.- № 4.- 2004.

29. Фирсов А.А., Пиотровский В.К. Фармакокинетические методы в биофармации: оценка биодоступности и пресистемная элиминация лекарственных средств // Итоги науки и техники. Серия: Фармакол. Химиотер. Средства.- М., 1984.- Т.14.- С. 114-224.

30. Пиотровский В.К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики// Фармакол. и токсикол. - 1986.- Том XLIX, № 5.- С. 118-127.

31. Gamaoka K., Nakagawa T., Uno T. Statistical moments in pharmacokinetics // J. Pharmacokinet. Biopharm.- 1978.- Vol. 6, № 6.- P. 547-558.

32. Рембовский В.Р., Антонова О.М. [и др.] Способ определения состояния системы микросомального окисления in vivo: Патент № 2227296.- Заявл. 22.01.2002; Оpubл. 20.04.2004// Изобретения. Полезные модели.- 2004.- № 26.

33. Рембовский В.Р., Антонова О.М. Способ оценки микросомальной системы печени при действии ксенобиотиков алкилирующего типа: Патент № 2104539 РФ. - Заявл. 23.06.95; Оpubл. 10.02.98// Изобретения.- 1998.- № 4.

34. Мартынова Л.А., Пузин М.Н., Селезнев А.Н. Клиническая фармакокинетика карбамазепина // Журнал невропатологии психиатрии им. С.С. Корсакова.- 1989.- т.89, вып. 10.- с. 145-148.