

ФАРМАКОКИНЕТИКА и ДИНАМИКА



- Основные механизмы доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц 3
- Изучение эффектов инъекционной формы гомантана на экспериментальных моделях паркинсонического синдрома 10
- Изучение фармакодинамики наноразмерной формы феназепам на основе поли (бутил) цианоакрилатных наночастиц 17
- Фармакокинетические свойства нового производного ГАМК цитрокарда: распределение и тканевая биодоступность 26
- Биозквивалентность капсулированных форм пипемидовой кислоты у добровольцев 30
- Биозквивалентность таблетированных форм триметазидина у добровольцев 34
- Исследование сравнительной фармакокинетики и биозквивалентности препаратов Кардиопрil и Монопрil® 38
- Открытое, рандомизированное, перекрёстное исследование сравнительной фармакокинетики и биозквивалентности препаратов Сантодарон и Кордарон 46
- Исследование биозквивалентности рилузола с использованием УЭЖХ-МС/МС метода 56

№2.2012

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№2
2012



Издательство
ОКИ
учредитель

Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора

Фирсов Александр Алексеевич

член-корр. РАМН, д.б.н., профессор, Москва

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д.б.н., Москва

Редакционная коллегия

Белолипецкая

Вера Геннадиевна

к.б.н., Москва

Белоусов Юрий Борисович

член-корр. РАМН, д.м.н.,

профессор, Москва

Бондарева

Ирина Борисовна

д.б.н., Москва

Воронина

Татьяна Александровна

заслуженный деятель науки

РФ, д.м.н., профессор, Москва

Ковалёв Георгий Иванович

д.м.н., профессор, Москва

Кулмагамбетов

Ильяс Райханович

д.м.н., профессор, академик

НАН, Казахстан, Алматы

Мирзоян Рубен Симонович

заслуженный деятель науки

РФ, д.м.н., профессор, Москва

Насонов

Александр Сергеевич

к.б.н., Москва

Раменская

Галина Владиславовна

д.ф.н., профессор, Москва

Сариев Абрек Куангалиевич

д.м.н., профессор, Москва

Соколов

Андрей Владимирович

д.б.н., Москва

Спасов

Александр Алексеевич

академик РАМН, д.м.н.,

профессор, Волгоград

Стародубцев

Алексей Константинович

д.м.н., профессор, Москва

Сычёв

Дмитрий Александрович

д.м.н., профессор, Москва

Тюрников

Иван Николаевич

член-корр. РАМН, д.м.н.,

профессор, Волгоград

Чистяков

Виктор Владимирович

д.ф.н., профессор, Москва

Выпускающая группа

Белоусов

Дмитрий Юрьевич

Ответственный за выпуск

журнала,

генеральный директор

ООО «Издательство ОКИ»

+7 (910) 449-22-73

+7 (926) 568-17-35

e-mail: clinvest@mail.ru

сайт: www.izdat-ok.ru

Смоленцев

Алексей Иванович

Дизайн, верстка

e-mail: verstkomp@gmail.com

Афанасьева

Елена Владимировна

Финансовый директор

ООО «Издательство ОКИ»,

подписка

+7 (916) 986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

Подписано в печать 12.01.2013 г. Типография Код-полиграф. Тираж 1000 экз.

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН

Тел./факс: +7 (495) 601-21-57; e-mail: clinvest@mail.ru

Журнал «Фармакокинетика и Фармакодинамика» является приложением к журналу «Качественная клиническая практика». Журнал «Качественная клиническая практика» зарегистрирован Комитетом РФ по печати 28.05.2001 г. Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №77-9142. Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

Сайты

Pharmacokinetics.ru

ClinVest.ru

Clinical-Pharmacy.ru

Журналы

Фармакокинетика и Фармакодинамика

Качественная клиническая практика

Клиническая фармация

WEB-порталы

HealthEconomics.ru

Market-Access-Solutions.ru

Izdat-Ok.ru

Центр фармакоэкономических исследований

Market Access Solutions

Издательство ОКИ

СОДЕРЖАНИЕ

От главного редактора

(Жердев В.П.) 2

Актуальные обзоры

Основные механизмы доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц (Балабаньян В. Ю., Гельперина С. Э.) 3

Исследования фармакодинамики

Изучение эффектов инъекционной формы гимантана на экспериментальных моделях паркинсонического синдрома (Капица И. Г., Кокшенев И. И., Вальдман Е. А., Воронина Т. А.) 10

Изучение фармакодинамики наноразмерной формы феназепама на основе поли (бутил) цианоакрилатных наночастиц (Балабаньян В. Ю., Разживина В. А., Максименко О. О., Кондрахин Е. А., Ковалев Г. И., Воронина Т. А.) 17

Фармакокинетические исследования

Фармакокинетические свойства нового производного ГАМК цитрокарда: распределение и тканевая биодоступность (Тюрников И. Н., Перфилова В. Н., Смирнова Л. А., Рябуха А. Ф., Сучков Е. А., Лебедева С. А.) 26

Исследования биоэквивалентности

Биоэквивалентность капсулированных форм пипемидовой кислоты у добровольцев (Алтынбеков С. А., Джолдыгулов Г. А., Серяков В. Н., Будац Я. М., Курилов О., Жердев В. П.) 30

Биоэквивалентность таблетированных форм триметазидина у добровольцев (Алтынбеков С. А., Джолдыгулов Г. А., Серяков В. Н., Будац Я. М., Курилов О., Колыванов Г. Б.) 34

Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Кардиопрil и Монопрil® (Сариев А.К., Абаимов Д.А., Ширяева М.В., Прохоров Д.И., Алтынбеков С.А., Джолдыгулов Г.А., Серяков В.Н., Будац Я.М., Курилов О.) 38

Открытое, рандомизированное, перекрёстное исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Сантодарон и Кордарон (Абаимов Д. А., Сариев А. К., Ширяева М. В., Прохоров Д. И., Алтынбеков С. А., Джолдыгулов Г. А., Серяков В. Н., Будац Я. М., Курилов О.) 46

Исследование биоэквивалентности рилузола с использованием УЭЖХ–МС/МС метода (Подпружников Ю. В., Сабко В. Е., Юрченко В. В., Кравец Н. Н., Рыбьянова Л. П., Зупанец И. А., Безуглая Н. П.) 56

Информация

Список условных обозначений 65

СОДЕРЖАНИЕ



Уважаемые читатели!

Перед Вами 2-й номер журнала «Фармакокинетика и фармакодинамика», в котором нашли отражение некоторые фармакокинетические, фармакодинамические и биофармацевтические проблемы, связанные с изучением как новых оригинальных, так и воспроизведенных лекарственных средств. Ряд представленных статей — это первые результаты научных разработок, выполняемых в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 17 февраля 2011 г. № 91.

В журнале представлены экспериментальные данные по изучению эффективности нового лекарственного вещества с противопаркинсонической активностью, которое находится на стадии внедрения в медицинскую практику. Представлены также данные по изучению распределения и тканевой доступности другого нового соединения — цитрокарда, а также подходы к созданию новой лекарственной формы хорошо известного в нашей стране анксиолитика феназепама на основе поли(бутил)цианоакрилатных наночастиц.

Специалистов, работающих в области изучения доставки лекарственных веществ к месту его фармакологического действия, может заинтересовать обзор Балабаньяна В.Ю. и Гальпериной С.Э. «Основные механизмы доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц».

Кроме того, мы сочли целесообразным включать в журнал результаты исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств, проведенных на добровольцах, с целью их регистрации в различных странах СНГ.

Редколлегия журнала обращается к специалистам в области фармакокинетике и биофармации направлять статьи, связанные с изучением скорости и степени всасывания лекарственных веществ, биотрансформации с выявлением активных метаболитов, проницаемости через гисто-гематические барьеры и доставки к месту действия, тканевой доступности, взаимосвязи между фармакокинетикой и фармакодинамикой, выбора оптимального пути введения и лекарственных форм с учётом биодоступности, выведения из организма.

Надеемся на плодотворное сотрудничество в новом 2013 году.

*Главный редактор
Заслуженный деятель науки РФ, д.м.н.,
профессор В.П. Жердев*

Основные механизмы доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц

Балабаньян В. Ю.¹, Гельперина С. Э.²

¹ — ООО «Технология лекарств», г. Химки, Московская область

² — ООО «НПК «Наносистема», г. Москва

Резюме

В обзоре рассмотрены возможные механизмы транспорта лекарственных веществ через гематоэнцефалический барьер в составе полимерных наночастиц. Представлены экспериментальные данные о влиянии поверхностно-активных веществ и апополипротеинов плазмы крови на способность полимерных наночастиц доставлять лекарственные вещества в мозг.

Ключевые слова: полимерные наночастицы, гематоэнцефалический барьер, апополипротеины, рецептор-зависимый эндоцитоз.

Мозг является одним из наименее доступных объектов для фармакотерапии из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), который регулирует обмен веществ между кровью и нервной тканью (мозгом). Основными структурными элементами ГЭБ являются мембраны клеток эндотелия, периваскулярная базальная мембрана, а также мембраны ножек глиальных клеток, окружающих сосуды [1]. Отличительной особенностью эндотелиальных клеток капилляров мозга и хориоидального (сосудистого) сплетения желудочков мозга являются плотные межклеточные контакты, образующиеся при участии трансмембранных белков (рис. 1). Эти эндотелиальные клетки отличаются низкой пиноцитарной активностью. Кроме того, в капиллярах мозга практически отсутствуют фенестры. Благодаря этому ГЭБ создаёт надёжную преграду на пути циркулирующих в крови продуктов обмена веществ и ксенобиотиков, не позволяя им проникать в мозг путём диффузии. Поглощение и экскреция жизненно важных соединений, таких как аминокислоты, гексозы, нейропептиды и белки осуществляется при участии специфических транспортных систем. Путём пассивной диффузии преодолевать ГЭБ могут только низкомолекулярные

липофильные соединения (м.м.<500 Да) [2, 3]. Однако многие липофильные молекулы немедленно удаляются из эндотелиальных клеток с помощью трансмембранных белков, таких как Р-гликопротеин (Р-gp) [4]. Р-гликопротеин функционирует как АТФ-зависимый насос, выбрасывая липофильные молекулы из эндотелиальных клеток, что препятствует их проникновению и накоплению в тканях мозга (рис. 1).

Вследствие этого многие потенциально эффективные лекарственные вещества (ЛВ), предназначенные для лечения заболеваний центральной

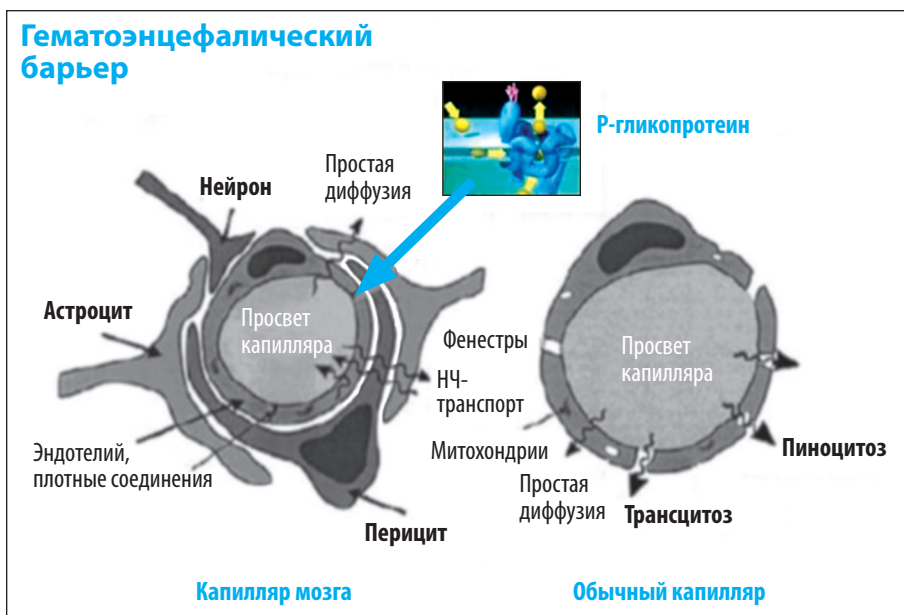


Рис. 1. Строение стенки капилляра мозга

нервной системы (ЦНС), проявляя высокую активность *in vitro*, оказываются неэффективными при введении в организм, поскольку ГЭБ препятствует поступлению этих веществ в мозг в терапевтически значимых концентрациях. Разработка безопасных и неинвазивных методов доставки ЛВ в мозг представляет собой серьезную проблему, для решения которой нужны новые стратегии.

Перспективным направлением исследований в этой области является разработка наносомальных систем доставки. Так было показано, что доставку в мозг ЛВ, не способных преодолевать ГЭБ, можно осуществить с помощью коллоидных систем доставки на основе полибутилцианоакрилатных (ПБЦА) наночастиц (НЧ), поверхность которых модифицирована полисорбатом 80 (ПС-80). Используя указанный носитель, удалось доставить в мозг гексапептид даларгин, четвертичное аммониевое соединение — прозерин, а также лоперамид и доксорубин — это вещества, которые, являясь субстратами Р-гликопротеина, не способны преодолеть ГЭБ [5–11]. Впоследствии применение ПБЦА наночастиц, покрытых ПС-80, позволило обеспечить транспорт в мозг веществ макромолекулярной природы — белков с нейротрофической активностью: фактора роста нервов и рекомбинантного эритропоэтина человека [12–14, 26]. Факт поступления этих веществ в мозг с помощью наночастиц был доказан путём фармакологических тестов, демонстрирующих центральное действие наносомальных форм, в то время как свободные вещества такого действия не оказывали. Эти результаты послужили основанием для создания совершенно новой концепции о том, что наночастицы могут служить средством доставки в мозг веществ, которые в свободном виде не способны преодолеть ГЭБ.

Согласно современным представлениям можно предположить, что наночастицы доставляют вещества через ГЭБ с помощью следующих механизмов:

1. Неспецифическое повышение проницаемости ГЭБ (то есть повышение проницаемости мембран эндотелиальных клеток капилляров мозга или нарушение плотных контактов между этими клетками) в результате воздействия НЧ или поверхностно-активных веществ (ПАВ) (токсический эффект). В этом случае циркулирующие в крови частицы и ЛВ могут проникнуть в мозг.
2. Поступление ЛВ в мозг в результате повышения градиента концентрации кровь-мозг (то есть при повышении концентрации ЛВ в крови).
3. Взаимодействие НЧ с мембранами эндотелиальных клеток капилляров мозга (неспецифическое или рецептор-опосредован-

ное) и, как результат, поступление их внутрь клетки (эндоцитоз) или удержание вблизи клеточной мембраны. Можно представить, что в первом случае происходит деградация НЧ внутри клетки, затем выделение ЛВ и поступление его в мозг через апикальную мембрану эндотелиальной клетки капилляра. Во втором случае ЛВ выделяется из НЧ в непосредственной близости от клетки; при этом может создаваться микроокружение, способствующее проникновению ЛВ через клеточную мембрану в мозг.

4. Ингибирование АТФ-зависимых трансмембранных белков, таких как Р-gp, препятствующих поступлению субстратов в эндотелиальные клетки сосудов мозга.

Механизм 1: неспецифическое повышение проницаемости ГЭБ

Первый из названных выше механизмов, а именно неспецифическое повышение проницаемости ГЭБ в результате токсического действия наночастиц и/или ПАВ, сразу казался маловероятным, поскольку ни в одном из многочисленных экспериментов *in vivo* мы не наблюдали клинических признаков нейротоксичности. С другой стороны, если бы барьерные функции ГЭБ действительно нарушались, то в связывании ЛВ с НЧ не было бы необходимости: при введении после НЧ эти вещества могли бы проникать через нарушенный ГЭБ в результате простой диффузии.

С целью подтверждения этой гипотезы был проведён эксперимент, позволяющий судить о состоянии ГЭБ после введения ПБЦА НЧ, покрытых ПС-80. В этом эксперименте определяли анальгезирующее действие даларгина, свободного или включённого в ПБЦА НЧ, при различных режимах введения [15]. Даларгин является агонистом опиоидных рецепторов, однако не оказывает анальгезирующего действия при внутривенном введении, поскольку практически не проникает в мозг, являясь субстратом Р-gp. В то же время, как ранее показал *Аляутдин Р. Н. и соавторы*, даларгин, связанный с ПБЦА НЧ, покрытыми ПС-80, значительно понижает порог болевой чувствительности мышей [16]. Более того, анальгезирующий эффект даларгина устранялся антагонистом опиоидных рецепторов — налоксоном, что свидетельствует о воздействии связанного с НЧ даларгина на опиоидные рецепторы ЦНС, то есть о его проникновении через ГЭБ. Анальгезирующее действие оценивали в тесте отдёргивания хвоста (tail-flick test). Увеличение промежутка времени, которое требуется мышам для того, чтобы ощутить боль при нагревании хвоста и отдёргнуть его, свидетельствует о повышении порога их болевой

Таблица

Анальгезирующий эффект (% от максимально возможного эффекта, % MPE) после внутривенного введения мышам даларгина (доза 7,5 мг/кг) и ПБЦА наночастиц, покрытых полисорбатом 80 (n=6)

Группы	% MPE (ср.± SD)			
	Время после введения			
	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин
Пустые ПБЦА наночастицы	3,8±3,3	1,5±9,0	0,75±3,2	3,9±4,3
Даларгин в растворе	2,3±4,6	10±9,8	9,3±2,8	4,7±5,1
ПБЦА наночастицы, нагруженные даларгином и покрытые ПС-80	8,6±6,2	35±11,7*	52±20,2**	26±13,4*
ПБЦА наночастицы, покрытые ПС-80 и смешанные с даларгином <i>ex tempore</i>	6,1±8,3	3,3±7,0	4,5±5,1	10,3±4,3
Введение даларгина через 5 мин после ПБЦА наночастиц, покрытых ПС-80	3,7±8,4	5,2±6,9	3,9±4,6	7,8±11,4
Введение даларгина через 30 мин после ПБЦА наночастиц, покрытых ПС-80	4,9±5,9	5,2±11,1	0,7±4,8	3,5±7,0

Примечания: * = 2p < 0,05; ** = 2p < 0,01 по сравнению с даларгином в растворе

чувствительности по сравнению с интактным состоянием. Как видно из данных, приведённых в таблице, значительное понижение порога болевой чувствительности достигалось только при введении даларгина, сорбированного на НЧ, покрытых ПС-80. Анальгезирующее действие самого даларгина или НЧ, введённых по отдельности, было незначительно. Последовательное введение НЧ и свободного даларгина (через 5 и 30 минут после введения НЧ) не привело к увеличению анальгезирующего эффекта.

Результаты этого эксперимента позволяют сделать два важных вывода:

1. внутривенное введение ПБЦА НЧ, покрытых ПС-80, не приводит к повышению проницаемости ГЭБ, достаточному для проникновения через него низкомолекулярных субстратов Р-gr;
2. субстраты Р-gr проникают в мозг, только будучи связанными с НЧ, покрытыми ПС-80.

Кроме того, целостность ГЭБ при контакте с НЧ была исследована в опытах *in vitro* [15]. В опытах использовали модель ГЭБ, состоящую из совмещённых слоёв эндотелиальных клеток капилляров мозга быка и астроцитов крысы. В качестве маркеров проницаемости ГЭБ использовали [³H]-инулин и [¹⁴C]-сахарозу. Было показано, что количество этих гидрофильных маркёров, проникающих через ГЭБ, не изменяется после инкубации клеток с НЧ, как в присутствии, так и в отсутствие ПС-80.

Таким образом, как показывают результаты исследований *in vivo* и *in vitro*, механизм доставки наночастиц и/или связанных с ними веществ в мозг не связан с нарушением барьерной функции ГЭБ.

Механизм 2: доставка в мозг в результате повышения градиента концентраций кровь-мозг

Непроницаемость ГЭБ относительна, поскольку способность ЛВ проникать через ГЭБ в значительной степени зависит от концентрации этих веществ в крови. В соответствии с правилом фармакокинетики, сформулированным У. Пардриджем [3]: количество вещества, доставляемого в мозг, пропорционально коэффициенту проницаемости ГЭБ и величине интегрального показателя площади под фармакокинетической кривой «концентрация в плазме-время» (AUC). Таким образом, количество поступающего в мозг ЛВ может возрастать при увеличении его концентрации и/или времени циркуляции в крови.

Одним из путей, позволяющим увеличить время циркуляции ЛВ, является применение в качестве носителей длительно циркулирующих наночастиц. Наиболее распространённый подход к созданию таких частиц состоит в гидрофилизации их поверхности путём создания пространственного (стерического) барьера, препятствующего сорбции белков. Стерическая стабилизация наночастиц создаёт так называемый «стелс-эффект» (от англ. *stealth* — невидимый), позволяющий НЧ стать «невидимыми» для макрофагов и избежать захвата. Технология «стелс» обеспечивает продолжительную циркуляцию НЧ в крови, а значит, в соответствии с упомянутым выше правилом фармакокинетики, должна способствовать доставке частиц и связанного с ними ЛВ в мозг. Однако в случае ПБЦА НЧ, модифицированных ПС-80, такая закономерность не наблюдается. Действительно, как показывают данные фармакокинетического

исследования наносомальной формы доксорубина [17], а также данные ряда авторов, изучавших влияние ПС-80 на распределение НЧ [18, 19], эффективность этого ПАВ как «стелс-агента» невысока. Модификация ПБЦА НЧ полисорбатом привела лишь к незначительному повышению концентрации доксорубина в плазме: показатель AUC для плазмы возрос лишь на 70% по сравнению с немодифицированными частицами (рис. 2).

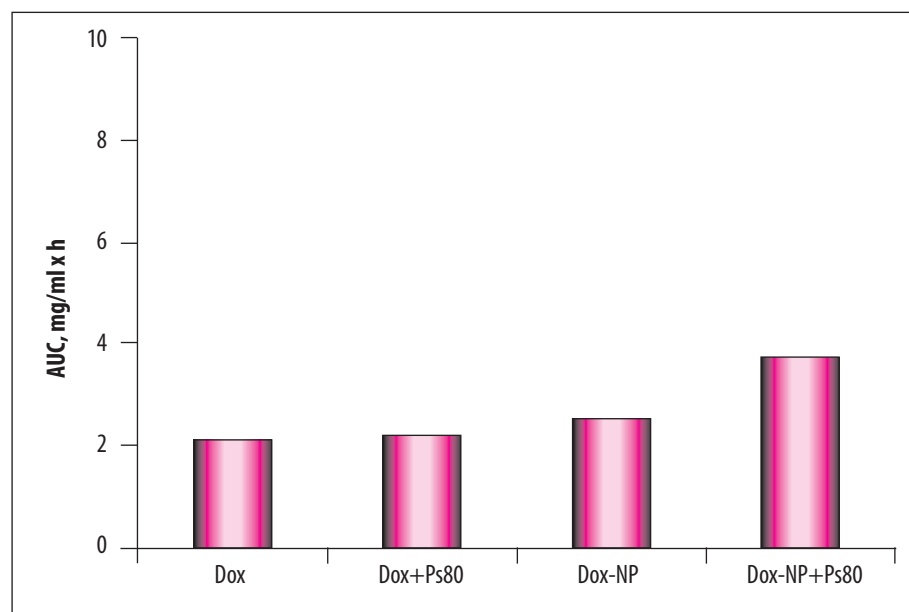


Рис. 2. Показатели AUC различных форм доксорубина при в/в введении крысам в дозе 5 мг/кг
Dox — раствор доксорубина; Dox+Ps80 — раствор доксорубина с полисорбатом 80;
Dox-NP — доксорубин, включённый в наночастицы; Dox-NP+Ps80 — доксорубин, включённый в наночастицы, модифицированные полисорбатом 80

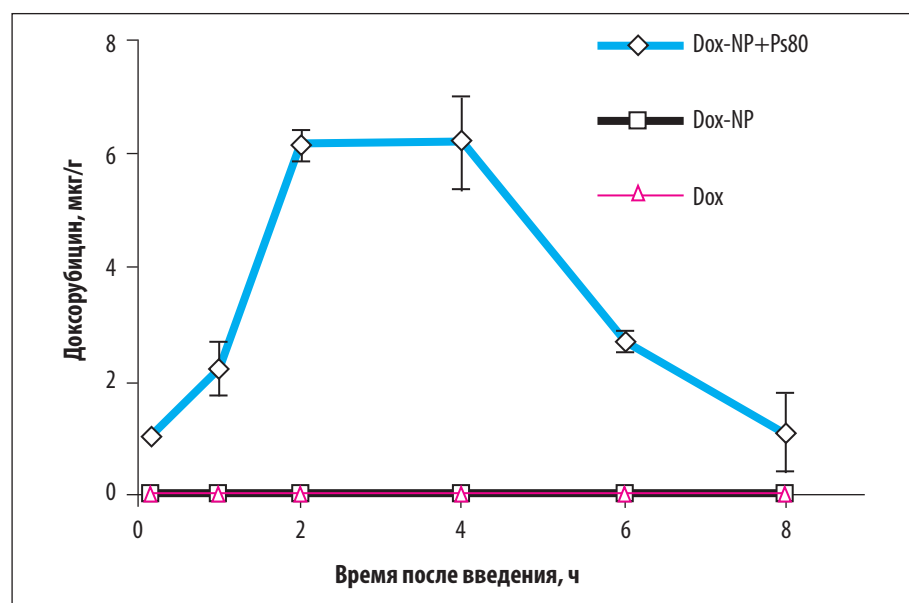


Рис. 3. Уровень концентрации доксорубина, ассоциированного с наночастицами, модифицированными полисорбатом 80, в головном мозге крыс при в/в введении в дозе 5 мг/кг
Dox — раствор доксорубина; Dox-NP — доксорубин, включённый в наночастицы;
Dox-NP+Ps80 — доксорубин, включённый в наночастицы, модифицированные полисорбатом 80

Однако показатель AUC для мозга почти в 10 раз превышал соответствующий показатель для плазмы [17]. При этом только введение модифицированных НЧ привело к достижению в мозге весьма высокой концентрации доксорубина — 6 мкг/г, в то время как при введении немодифицированных НЧ концентрации оставались ниже 0,1 мкг/г (рис. 3).

Таким образом, модификация НЧ полисорбатом позволила повысить концентрацию доксорубина в мозге, по крайней мере, в 60 раз.

Тем не менее, исследования, проведённые впоследствии рядом авторов, подтвердили справедливость сформулированного выше правила фармакокинетики. Действительно, при внутривенном введении применение стелс-частиц способствует росту концентраций ЛВ в мозге при одновременном росте интегрального показателя AUC плазмы. Так включение доксорубина в стелс-НЧ из твёрдых липидов позволило повысить AUC в плазме в 9 раз по сравнению со свободным антибиотиком, параллельно возросла и его концентрация в мозге [20]. Однако, следует отметить, что концентрация в мозге доксорубина при введении его в составе липидных НЧ, не превышала 0,25% от дозы, в то время как ПБЦА НЧ, покрытые полисорбатом, доставляли в мозг 1% дозы доксорубина и поддерживали этот уровень в течение 2 ч.

С другой стороны, некоторые стерически стабилизированные НЧ долго циркулируют в крови, но не проникают через ГЭБ. Так в исследовании П. Калво и соавт. адсорбция поллоксамина 908 на поверхности полигексадецилцианоакрилатных НЧ позволила существенно повысить время их циркуляции и концентрацию в плазме, однако концентрации частиц в мозге были незначительны [18]. В то же время, НЧ из полигексадецилцианоакрилата, модифицированные ковалентно

связанным полиэтиленгликолем, лучше проникали в мозг, хотя их концентрации в плазме были существенно ниже, чем у НЧ, модифицированных поллоксаминном 908.

Фармакокинетическое исследование, проведенное И. Бриггер и соавт. на крысах с интракраниальной глиобластомой, также показало, что сродство полигексадецилцианоакрилатных НЧ, модифицированных полиэтиленгликолем (ПЭГ), к неповрежденным участкам мозга нельзя рассматривать как результат исключительно диффузии этих носителей [21]. Не исключено, что, модификация поверхности ПЭГ способствует контакту НЧ с эндотелиальными клетками капилляров мозга, тогда как стерический эффект поллоксамина 908 не только обеспечивает защиту НЧ от опсонизации, но и препятствует такому контакту.

Было бы естественно предположить, что увеличение гидрофильности затруднит взаимодействие частиц с эндотелиальными клетками и помешает им преодолеть ГЭБ. Однако в действительности этого не происходит, что подтверждает предположение о том, что модификация ПЭГ играет важную роль в специфическом взаимодействии НЧ с эндотелиальными клетками ГЭБ.

Анализ описанных выше данных позволяет заключить, что в осуществлении переноса НЧ через ГЭБ могут участвовать различные механизмы. С одной стороны, как отмечалось выше, транспорт через ГЭБ с помощью длительно циркулирующих НЧ может быть результатом повышения концентрации частиц и связанных с ними ЛВ в плазме, и обусловлен ростом градиента концентраций в системе плазма-мозг. С другой стороны, ряд экспериментальных данных указывает на то, что эффективность носителей определяется не только (и не столько) длительностью циркуляции и достижением высоких концентраций в плазме, но и возможностью контакта частицы с клеточными мембранами, которая, в свою очередь, зависит от структуры поверхности (в том числе и от модифицирующего агента).

Так совершенно ясно, что феноменальный эффект полисорбата в случае ПБЦА НЧ — 60-кратное увеличение концентрации доксорубина в мозге, трудно объяснить незначительным повышением

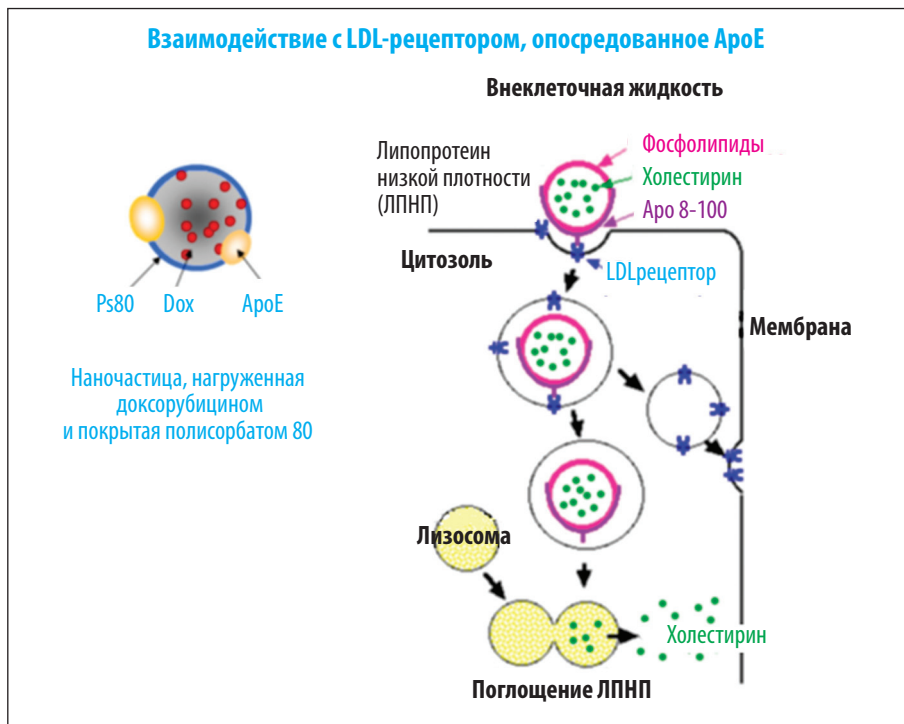


Рис. 4. Рецептор-зависимый эндоцитоз ЛПНП, опосредованный ApoE

градиента концентраций в системе кровь-мозг. Вероятно, эти носители используют другой механизм для проникновения в мозг.

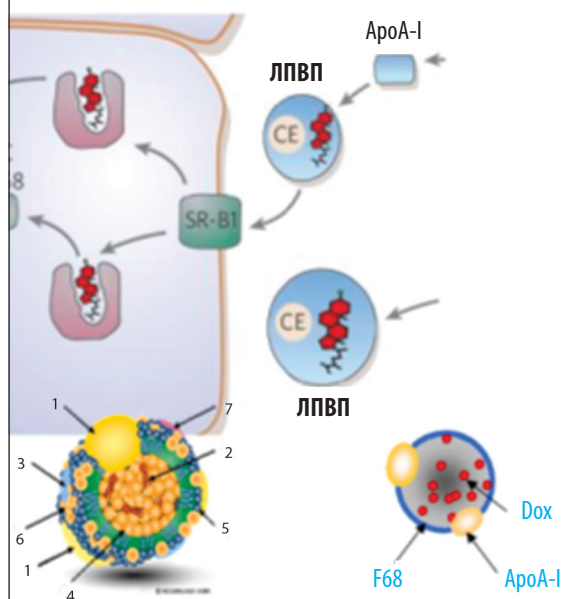
Механизм 3: доставка в мозг в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза

Описанные выше явления хорошо объясняет гипотеза, согласно которой ПБЦА НЧ, модифицированные ПС—80, интернализуются эндотелиальными клетками капилляров мозга в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза.

В 2002 году Й. Кройтер и соавт. показали, что полисорбат 80 способствует сорбции на поверхности ПБЦА НЧ белков плазмы — аполипопротеинов Е и В [22]. Эти данные позволили предположить, что НЧ проникают в мозг в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза, который является результатом взаимодействия этих белков с рецепторами к липопротеинам низкой плотности (ЛПНП-рецепторами или LDL-рецепторами), экспрессированными в мембранах эндотелиальных клеток капилляров мозга. ЛПНП-рецепторы воспринимают НЧ как агрегаты липопротеинов низкой плотности, поступающие в мозг из крови. Внутри эндотелиальной клетки частица подвергается биodeградации под действием ферментов и выделяет ЛВ, которое затем диффундирует через мембрану в межклеточное пространство (рис. 4).

Впоследствии было показано, что, несмотря на различную химическую структуру ПАВ,

**Предполагаемый механизм:
Взаимодействие АроА-I со сквенджер-рецептором SR-BI
эндотелиальных клеток, формирующих ГЭБ**



**Частица липопротеинов высокой плотности
с белками-переносчиками**

1 – АроА-I; 2 – триглицерид; 3 – АроС; 4 – эфиры холестерина;
5 – фосфолипиды; 6 – незатерифицированный холестерин; 7 – ароЕ

Рис. 5. Рецептор-зависимый эндоцитоз ЛПВП, опосредованный АроА-I (по С. Э. Гельпериной)

CE — холестерин этерифицированный; F68 — плютроник F68

использованных для модификации, профили белков плазмы, сорбированных на поверхности ПБЦА НЧ, обнаружили как количественное, так и качественное сходство [23]. При этом в значительном количестве присутствовал АроА-I (24% от общего количества). Возможно, что доставка веществ в мозг осуществляется путём взаимодействия АроА-I, адсорбированного на поверхности НЧ, со сквенджер-рецептором BI (SR-BI), экспрессируемым на поверхности эндотелиальных клеток, формирующих ГЭБ. Этот рецептор, экспрессируемый также и другими клетками (в том числе, гепатоцитами), участвует в переносе липидов от АроА-I внутрь клетки. При переносе липида в клетку АроА-I связывается с клеточной мембраной посредством рецептора SR-BI, который и передаёт липид клетке. После этого сам белок, уже лишённый липида, диссоциирует с поверхности клетки и возвращается в кровь. Вполне вероятно, что поступление наночастиц в эндотелиальные клетки осуществляется по той же схеме: АроА-I, адсорбированный на поверхности НЧ, взаимодействует с рецептором SR-BI, но вместо липида в клетку поступает частица (рис. 5).

В пользу этой гипотезы, несомненно, свидетельствует тот факт, что альбуминовые наночастицы, модифицированные АроА-I, также преодолевают ГЭБ и доставляют в мозг лоперамид [24]. Являясь субстратом Р-гр, агонист опиоидных рецепторов лоперамид не способен самостоятельно преодолеть ГЭБ и поэтому не оказывает анальгезирующего действия. Значительное снижение порога болевой чувствительности мышей, выявленное в тесте отдёргивания хвоста после внутривенного введения лоперамида, связанного с НЧ, модифицированными АроА-I, указывает на его проникновение в мозг.

Механизм 4: ингибирование Р-гр

Роль АТФ-зависимых транспортеров в доставке веществ через ГЭБ с помощью НЧ в настоящее время до конца не изучена. Тем не менее, все низкомолекулярные вещества, доставленные в мозг с помощью ПБЦА НЧ (в том числе даларгин, лоперамид, доксорубин), являются субстратами Р-гр, что и объясняет невозможность их независимого транспорта через ГЭБ. В пользу этой гипотезы может свидетельствовать тот факт, что доксорубин в составе ПБЦА НЧ преодолевает Р-гр-зависимую резистентность опухолевых клеток [25]. Этот феномен является результатом двух одновременно протекающих процессов: выделения доксорубина из НЧ и её биodeградации

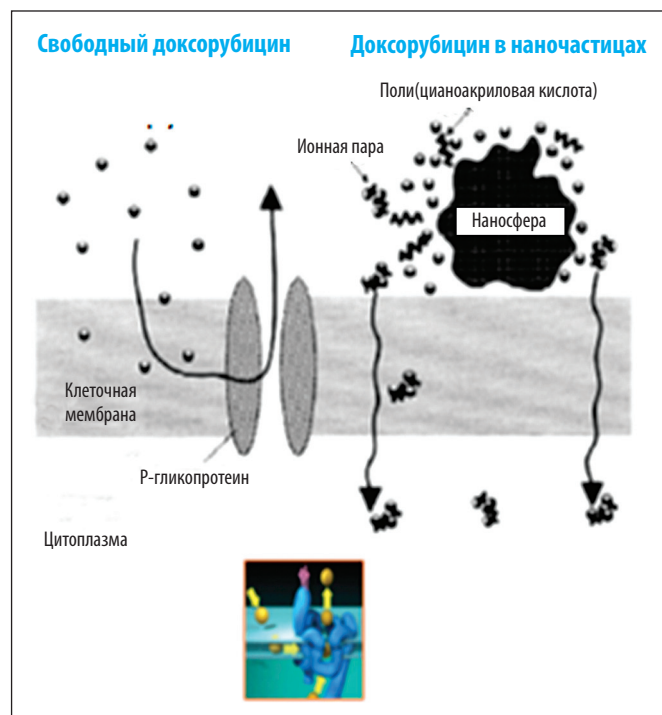


Рис. 6. Предположительный механизм, с помощью которого доксорубин в составе полиалкилцианоакрилатных наночастиц преодолевает резистентность опухолевых клеток, экспрессирующих Р-гр [25]

с образованием полицианоакриловой кислоты. Доксорубин и полицианоакриловая кислота образуют ионную пару, которая и проникает через клеточную мембрану, минуя Р-гр (рис. 6).

Не исключено, что этот же механизм способствует и доставке доксорубина в мозг. В этом случае присутствие АроА-I на поверхности НЧ также может играть важную роль. Действительно, удержание НЧ вблизи клеточной мембраны в результате взаимодействия со скавенджер-

рецептором при одновременной биодegradации и выделении доксорубина должно способствовать его проникновению в эндотелиальные клетки ГЭБ в обход Р-гр. Затем доксорубин проникает в мозг через апикальную мембрану клетки. При таком развитии событий захват НЧ этими клетками не является необходимым условием доставки веществ в мозг, а доставка доксорубина в мозг будет суммарным результатом действия двух механизмов.

Литература

1. Begley D. J. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol. Ther.* 2004. Vol. 104, P. 29–45.
2. Pardridge W. M. CNS drug design based on principles of blood–brain barrier Transport. *J. Neurochem.* 1998. Vol. 70, P. 1781–1792.
3. Wu D., Pardridge W. M. Pharmacokinetics and blood–brain barrier transport of an anti-transferrin receptor monoclonal antibody (OX26) in rats after chronic treatment with the antibody. *Drug Metab. Dispos.* 1998. Vol. 26, P. 937–939.
4. Cordon-Cardo C., O'Brien J. P., Casals D., et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood–brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989. Vol. 86, P. 695–698.
5. Alyautdin R., Gothier D., Petrov V. et al. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995. Vol. 41, P. 44–48.
6. Alyautdin R. N., Petrov V. E., Langer K., Berthold A., Kharkevich D. A., Kreuter J. Delivery of loperamide across the blood–brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.* 1997. № 14, P. 325–328.
7. Gulyaev A. E., Gelperina S. E., Skidan I. N. et al. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm. Res.* 1999. № 6, P. 1564–1569.
8. Kreuter J., Gelperina S. Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori* 2008. Vol. 94, P. 271–277.
9. Kreuter J., Alyautdin R. N., Kharkevich D. A., Ivanov A. A. Passage of peptides through the blood–brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res.* 1995. Vol. 674, P. 171–174.
10. Ambrosi A., Gelperina S., Khalansky A., et al. Influence of surfactants, polymer and doxorubicin loading on the anti-tumour effect of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in a rat glioma model. *J. Microencapsul.* 2006. Vol. 23, P. 582–592.
11. Басел А., Петров В. Е., Балабаньян В. Ю. и др. Транспорт прозерина в головной мозг при помощи полибутилцианоакрилатных наночастиц, покрытых полисорбатом 80. *Рос. мед. журн.* 2006. № 4, С. 28–32.
12. Kurakhmaeva K. B., Djindjhashvili I. A., Petrov V. E. et al. Brain targeting of nerve growth factor using poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Drug Target.* 2009. № 17, P. 564–574.
13. Курахмаева К. Б., Воронина Т. А., Капица И. Г. и др. Антипаркинсоническое действие фактора роста нервов, сорбированного на полибутилцианоакрилатных наночастицах, покрытых полисорбатом-80. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2008. Т. 145, № 2, С. 221–224.
14. Балабаньян В. Ю., Солев И. Н., Елизарова О. С. и др. Нейропротекторный эффект человеческого рекомбинантного эритропоэтина, сорбированного на полимерных наночастицах, на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (модель геморрагического инсульта). *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2011. Т. 74, № 5, С. 8–13.
15. Kreuter J., Ramge P., Petrov V. et al. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm. Res.* 2003. Vol. 20, P. 409–416.
16. Kreuter J., Petrov V. E., Kharkevich D. A., Alyautdin R. N. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood–brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. *J. Control. Release* 1997. Vol. 49, P. 81–87.
17. Gulyaev A. E., Gelperina S. E., Skidan I. N. et al. Significant transport of doxorubicin into the brain with Ps 80-coated nanoparticles. *Pharm. Res.* 1999. V.16, P.1564–1569.
18. Calvo P., Gouritin B., Chacun H. et al. Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharm. Res.* 2001. Vol. 18, P. 1157–1166.
19. Araujo L., Loeberberg R., Kreuter J. Influence of the surfactant concentration on the body distribution of nanoparticles. *J. Drug Targeting.* 1999. V.6, P. 373–385.
20. Zara G. P., Cavalli R., Bargoni A. et al. Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues. *J. Drug Target.* 2002. Vol. 10, P. 327–335.
21. Brigger I., Morizet J., Aubert G. et al. Poly (ethylene glycol) -coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002. Vol. 303, P. 928–936.
22. Kreuter J., Shamenkov D., Petrov V. et al. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood–brain barrier. *J. Drug Target.* 2002. Vol. 10, P. 317–325.
23. Petri B., Bootz A., Khalansky A. et al. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *J. Control. Release* 2007. Vol. 117, P. 51–58.
24. Kreuter J., Hekmatara T., Dreis S. et al. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J. Control. Release* 2007. Vol. 118, P. 54–58.
25. Vauthier C., Dubernet C., Chauvierre C., Brigger I., Couvreur P. Drug delivery to resistant tumors the potential of poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Control. Release.* 2003. V. 93, N 2, P. 151–160.
26. Wohlfart S., Gelperina S., Kreuter J. Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release* 2012. Vol. 161, P. 264–273.

Изучение эффектов инъекционной формы гимантана на экспериментальных моделях паркинсонического синдрома

Капица И. Г., Кокшенев И. И., Вальдман Е. А., Воронина Т. А.
ФГБУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» РАМН, Москва

Резюме

Гимантан в инъекционной лекарственной форме при различных способах однократного и субхронического парентерального введения проявляет позитивный дозозависимый эффект на различных экспериментальных моделях паркинсонического синдрома. Сравнительный анализ активности инъекционной формы гимантана при парентеральном введении, выявил большую выраженность эффекта внутривенного применения гимантана относительно внутрибрюшинного. Полученные результаты указывают на возможность применения инъекционной формы гимантана при внутривенном введении в меньшей дозе. При сравнении противопаркинсонического действия гимантана при его парентеральном введении (особенно внутривенном) с активностью амантадина гидрохлорида (Мидантана) показан более выраженный эффект гимантана в условиях использованных экспериментальных моделей.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, паркинсонический синдром, гимантан, инъекционная форма, парентеральное введение, ПК-Мерц, Мидантан, амантадин

Введение

Болезнь Паркинсона — одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, проявлением которого являются характерные двигательные нарушения акинезия, тремор, ригидность и нарушения походки. Особую сложность при лечении болезни Паркинсона представляют острые формы паркинсонического синдрома (ПС), в частности акинетические кризы, для купирования которых требуется парентеральное введение противопаркинсонических препаратов. В настоящее время в клинической практике существует только один препарат для инфузионного введения — производное аминоксанта — амантадин сульфат (ПК-Мерц) [6]. Препараты амантадина (амантадин хлорид, амантадин сульфат) оказывают умеренное положительное действие на все проявления болезни и хорошо переносятся. Однако улучшение при приеме амантадина нередко бывает кратковременным из-за развития толерантности. Механизм действия амантадина преимущественно связан с блокадой глутаматных NMDA рецепторов, блокадой обратного захвата дофамина и норадреналина, мягким холинолитическим действием [8]. При применении амантадина возможны существенные побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой системы и центральные эффекты: спутанность сознания, беспокойство, галлюцинации, сухость во рту.

Гимантан (N (2 адамантил) гексаметиленмина гидрохлорид) оригинальный отечественный

препарат из группы производных адамантана, обладает высокой активностью и широким спектром противопаркинсонических эффектов. В механизме действия препарата дофаминпозитивный эффект, свойства низкоаффинного неконкурентного блокатора ионного канала глутаматных рецепторов NMDA подтипа, обратимого ингибитора моноаминоксидазы (МАО), умеренная антирадикальная и иммуностропная активность [1]. Установлено, что гимантан уменьшает основные проявления экспериментального МФТП индуцированного ПС — олигокинезию, ригидность, тремор у мышей линии C57BL/6 и крыс [2, 4]. Доказаны преимущества гимантана по сравнению с рядом противопаркинсонических препаратов. На модели МФТП индуцированного паркинсонизма активность гимантана проявляется при использовании меньших доз, по сравнению с амантадином гидрохлоридом (Мидантаном). При устранении нейролептической каталепсии действие гимантана сопоставимо с эффектами L ДОФА и циклодола и превосходит активность Мидантана. Также, в противоположность Мидантану, гимантан эффективно устраняет дрожательные проявления на моделях тремора, вызванного оксотренином и ареколином, не уступая по выраженности эффекта циклодолу [1]. Доказана эффективность гимантана у больных с ранними стадиями болезни Паркинсона при однократном приеме в дозе 25 мг в сутки и определены перспективы внедрения препарата в клиническую практику [4].

С целью расширения возможностей применения гимантана при лечении болезни Паркинсона в НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН разработана лекарственная форма для парентерального введения [5].

Целью работы было изучение противопаркинсонических эффектов инъекционной формы гимантана при различных видах парентерального введения на моделях ПС в сравнении с мидантаном.

Методы исследования

Эксперименты проводились на самцах белых аутбредных мышей и мышей линии C57BL/6 массой 24–28 г и на самцах белых аутбредных крыс 9–10 месячного возраста, массой 280–300 г, из питомника «Столбовая» (РАМН). В каждой группе использовали 10–12 животных.

Исследуемые вещества — гимантан, мидантан (НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН, Россия). В работе использовались вещества: ареколин (Serva Company), галоперидол (Гедеон Рихтер, Венгрия), 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина гидрохлорида (МФТП) и 1-метил-4-фенилпиридиния⁺ (МФП⁺) (Sigma Aldrich Company).

При однократном парентеральном введении исследуемые вещества вводили за 30 минут (внутрибрюшинно) или за 10 минут (внутривенно) до введения ареколина или МФТП. Животным контрольной группы вводили дистиллированную воду.

Методика ареколинового тремора воспроизводилась на самцах белых аутбредных мышей [3]. Ареколин (специфический холинергический агонист) вводили подкожно в дозе 25 мг/кг. Регистрировали латентный период наступления и продолжительность генерализованного мелко- и среднеамплитудного тремора тела животного.

Каталепсию вызывали внутрибрюшинным введением галоперидола в дозе 1 мг/кг белым нелинейным мышам [3]. Исследуемые вещества вводили одновременно с галоперидолом. Антагонизм с галоперидолом оценивали по способности исследуемых веществ уменьшать время каталептического состояния у животных. Мышь располагали у горизонтального стержня диаметром 0,5 см, закреплённого на высоте 4 см, таким образом, что она опиралась на стержень обеими передними лапками («поза лектора»). Попытки придать животному нужную позу продолжали не более 1 мин. Фиксировали время пребывания животного в неподвижном состоянии — «позе лектора». Максимальное время наблюдения составляло 2 мин.

Для оценки противопаркинсонической активности соединений использовали модель ПС,

вызванного введением животным нейротоксина МФТП [3, 8, 11]. Нейротоксин МФТП оказывает влияние на центральное патогенетическое звено развития ПС, вызывает избирательное повреждение дофаминергических нейронов чёрной субстанции. Исследования проводили на мышах линии C57BL/6. МФТП вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг.

Эффективность гимантана в инъекционной лекарственной форме оценивали по его способности ослаблять основные проявления ПС, вызываемого введением МФТП: ригидность и олигокинезию. Оценку выраженности ригидности проводили через 10–15 минут после введения нейротоксина МФТП, измеряя длину шага животного (Stride Length Test) [10]. С этой целью передние и задние лапы животного окрашивали нетоксичными красками разных цветов, опускали мышь в пенал (высота и ширина стенок 8 см, длина 50 см), выстланный белой бумагой и измеряли расстояние (по прямой) между следами передней и задней лапок в 4–5 шагах животного.

Для оценки олигокинезии — снижения количества и качества двигательной локомоторной активности животных после введения МФТП использовали методики: «Открытое поле», тест горизонтальный «вращающийся стержень» (Rota Rod test, Ugo Basile, Италия) и тест «вертикальный стержень» (Pole test).

«Открытое поле» представляет собой квадратный ящик размером 40х40 см и высотой 20 см, разделённый на 25 квадратов со стороной 8 см. Мышь помещали в центр и в течение 3-х минут осуществляли регистрацию двигательной активности (число горизонтальных и вертикальных перемещений). Регистрацию активности животных в «Открытом поле» проводили через 90 минут после введения нейротоксина МФТП.

Тест «вращающейся стержень» использовали для оценки моторного дефицита и степени нарушения координации движений. Животных помещали на горизонтальный стержень диаметром 3 см, который вращали с постоянной скоростью 10 оборотов в минуту или с нарастающей скоростью — каждые 7 секунд на 1 оборот, где: начальная скорость — 5, конечная — 30 оборотов в минуту. Регистрировали время удерживания животного на вращающемся стержне (максимально в течение 200 с). Тестирование в условиях вращающегося стержня проводили через 120 минут и 7 суток после введения МФТП.

Для оценки олигокинезии также применялся тест «вертикальный стержень» [7]. Мышь помещали на вершину деревянного стержня (50 см высотой и 1 см в диаметре, обёрнутого бинтом с пробковым набалдашником диаметром 1,5 см) носом вверх и замеряли время, необходимое животному

для ориентирования: поворота головой вниз (t поворота) и спуска вниз по стержню (t спуска) в течение 3-х посадок.

На 7-е сутки после введения МФТП мышам линии C57BL/6 с ПС вводили галоперидол в малой дозе 0,1 мг/кг, не вызывающей акинетических симптомов у интактных животных [12]. Катаlepsию оценивали методом, описанным выше.

ПС у крыс моделировали внутримозговым введением МФП+ [3]. Токсический эффект нейротоксина МФТП на нейроны чёрной субстанции обусловлен его конечным продуктом окисления МФП+, который обладает высоким сродством к дофаминергическим нейронам [9]. Введение МФП+ непосредственно в чёрную субстанцию мозга крыс вызывает выраженную дегенерацию дофаминергических нейронов чёрной субстанции, снижение уровня дофамина и двигательные нарушения, характерные для ПС.

Животным под наркозом по координатам стереотаксического атласа в компактную зону чёрной субстанции билатерально с помощью микрошприца Гамильтона вводили 10 мкг МФП+ в 2 мкл физиологического раствора. Животным контрольной группы в каждое ядро чёрной субстанции вводили по 2 мкл физиологического раствора. Исследуемые вещества вводили на фоне развёрнутой картины ПС в течение 7 дней. Тестирование проводили на 7-й день после введения нейротоксина МФП+ в чёрную субстанцию мозга крыс. Эффекты веществ оценивали по степени изменения олигокинезии в тесте «открытое поле» и моторного дефицита в тесте «вращающийся стержень». Установка «открытое поле» для крыс круглая арена диаметром 1 метр и высотой стенок 30 см с разделённым на сектора полом с отверстиями диаметром 2 см (всего 16 отверстий). Крысу помещают на арену и на протяжении 3-х минут регистрируют горизонтальную и вертикальную двигательную активность — по количеству пересечённых секторов и по числу стоек, соответственно и исследовательскую активность по числу обследованных отверстий.

Для оценки моторного (неврологического) дефицита и степени нарушения координации движений у крыс использовали тест «вращающийся стержень» (Rota Rod test, Ugo Basile). Животных помещали на горизонтальный стержень диаметром 5 см, вращающийся с постоянной скоростью 10 оборотов в минуту. Регистрировали время удерживания животных на вращающемся стержне (максимально в течение 200 с).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью пакета программ Statistica v. 6.0. Различия между группами оценивали непараметрическим критерием Манна-Уитни. Данные представлены в виде Mean±SEM.

Результаты и их обсуждение

У мышей введение ареколина вызывало развитие выраженного тремора всего тела при внутрибрюшинном введении гимантан в дозах 5, 10 и 20 мг/кг достоверно снижал продолжительность ареколинового тремора с максимальным эффектом в дозе 20 мг/кг. При внутривенном введении этот эффект гимантана значительно возрастал и проявлялся уже в дозе 2,5 мг/кг, при этом также достоверно увеличивался латентный период начала тремора. Препарат сравнения мидантан в дозе 20 мг/кг не обладал антитреморным действием. Более того, после введения мидантана отмечалась тенденция к увеличению продолжительности ареколинового тремора (табл. 1).

Таблица 1

Влияние гимантана в инъекционной лекарственной форме на ареколиновый тремор

Вещества, дозы, способ введения	Латентный период начала тремора, мин	Продолжительность тремора, мин
Ареколин (25 мг/кг, п/к) + дист. вода	0,38±0,12	15,13±1,41
Гимантан (5 мг/кг, в/б) + ареколин	0,38±0,06	10,04±0,33*
Гимантан (10 мг/кг, в/б) + ареколин	0,51±0,14	10,11±1,15*
Гимантан (20 мг/кг, в/б) + ареколин	0,57±0,17	8,54±0,39*
Гимантан (2,5 мг/кг, в/в) + ареколин	1,26±0,20*	10,24±0,78*
Гимантан (5 мг/кг, в/в) + ареколин	1,26±0,23*	6,49±2,12*
Мидантан (20 мг/кг, в/б) + ареколин	0,43±0,11	17,15±4,07

Примечания: * — $p < 0,05$ в сравнении с группой «ареколин» (по критерию Манна-Уитни); в/б — внутрибрюшинное; в/в — внутривенное; п/к — подкожное введение

Галоперидол в дозе 1 мг/кг (внутрибрюшинно) вызывал катаlepsию у 100% мышей. Гимантан в дозах 5–10 мг/кг при внутрибрюшинном введении дозозависимо снижал катаlepsогенный эффект галоперидола, уменьшая время застывания мышей в неудобной позе. Эффект зарегистрирован через 60 и 120 минут после введения нейролептика. При внутривенном введении гимантана в дозе 5 мг/кг его антикатаlepsическая активность оказалась равной эффекту внутрибрюшинного введения 10 мг/кг. Эффект мидантана в дозе 20 мг/кг, внутрибрюшинно, в условиях данного теста был ниже эффекта гимантана (табл. 2).

Эффективность инъекционной формы гимантана на модели ПС, вызванного однократным внутрибрюшинным введением нейротоксина МФТП в дозе 30 мг/кг мышам C57BL/6 изучали по влиянию на ригидность и олигокинезию.

Установлено, что через 10–15 минут после введения МФТП у мышей появлялись ретро- и/или латеропульсия и отчётливая ригидность, что вы-

Таблица 2

Антикаталептическое действие гимантана в инъекционной лекарственной форме

Вещества, дозы, способ введения	Время застывания мышей в позе «лектора», с	
	Через 60 мин после введения галоперидола	Через 120 мин после введения галоперидола
Контроль (дист. вода)	5,3±3,08	5,7±3,25
Галоперидол (1 мг/кг, в/б)	95,8±8,98#	108,3±9,01#
Гимантан (5 мг/кг, в/б) + галоперидол	64,0±3,71*	78,5±5,11*
Гимантан (10 мг/кг, в/б) + галоперидол	40,0±3,54*	69,1±7,14*
Гимантан (5 мг/кг, в/в) + галоперидол	42,0±3,21*	61,0±6,12*&
Мидантан (20 мг/кг, в/б) + галоперидол	61,3±14,12*	95,0±13,29

Примечание: # — $p < 0,05$ в сравнении с группой «Контроль»; * — $p < 0,05$ в сравнении с группой «Галоперидол»; & — $p < 0,05$ в сравнении с группой «Мидантан» (по критерию Манна-Уитни)

ражалось в нарушениях походки, напряжении передних и задних конечностей, изменении длины шага и появлении «горба». На фоне МФТП длина шага достоверно уменьшалась по сравнению с группой интактного контроля. Под влиянием гимантана (10 мг/кг внутрибрюшинно) отмечалось снижение ригидности, что выразилось в достоверном увеличении длины шага по сравнению с группой животных, получавших только МФТП. Выраженный эффект наблюдался и при внутривенном введении гимантана. Мидантан также достоверно снижал ригидность у мышей с ПС (табл. 3).

Таблица 3

Влияние гимантана в инъекционной лекарственной форме на ригидность мышей C57BL/6 с МФТП вызванным паркинсоническим синдромом

Вещества, дозы, способ введения	Длина шага, см
Контроль интактный, дист. вода	6,67±0,10
МФТП (30 мг/кг) в/б.	3,8±0,07#
Гимантан (5 мг/кг) в/б + МФТП	4,9±0,77*
Гимантан (10 мг/кг) в/б + МФТП	4,74±0,10*
Гимантан (5 мг/кг) в/в + МФТП	4,39±0,13*
Мидантан (20 мг/кг) в/б + МФТП	5,16±0,15*

Примечание: # — $p < 0,05$ в сравнении с группой интактного контроля; * — $p < 0,05$ в сравнении с группой, которой вводили только МФТП (по критерию Манна-Уитни)

Через 90 минут после введения МФТП у животных отмечалась высокая степень олигокинезии, которая регистрировалась по снижению горизонтальной и вертикальной двигательной активности в тесте «открытое поле». Гимантан, введенный

внутрибрюшинно в дозах 5, 10 и 20 мг/кг, повышал горизонтальную двигательную активность мышей с ПС, вызванным МФТП. Кроме того, после внутрибрюшинного введения гимантана в дозе 10 мг/кг у мышей с ПС достоверно повышался уровень вертикальной активности. При внутривенном введении гимантана в дозе 5 мг/кг также наблюдалось достоверное повышение горизонтальной двигательной активности животных. Препарат сравнения мидантан в дозе 20 мг/кг внутрибрюшинно также увеличивал горизонтальную двигательную активность (табл. 4).

Таблица 4

Влияние гимантана в инъекционной лекарственной форме на двигательную активность у мышей C57BL/6 с МФТП вызванным паркинсоническим синдромом в тесте «открытое поле»

Вещества, дозы, способ введения	Горизонтальная активность	Вертикальная активность
Контроль интактный	66,62±2,98	11,45±1,21
МФТП (30 мг/кг) в/б	3,58±1,10#	0,5±0,25#
Гимантан (5 мг/кг) в/б + МФТП	10,25±3,13#*	0,92±0,51#
Гимантан (10 мг/кг) в/б + МФТП	11,0±2,04#*	1,17±0,39#*
Гимантан (20 мг/кг) в/б + МФТП	13,75±4,04#*	1,42±0,68#
Гимантан (5 мг/кг) в/в + МФТП	10,38±2,40#*	0,25±0,16#
Мидантан (20 мг/кг) в/б + МФТП	13,5±4,98#*	0,16±0,16#

Примечание: # — $p < 0,01$, в сравнении с группой интактного контроля; * — $p < 0,05$ — относительно группы получавшей только МФТП (по критерию Манна-Уитни)

Через 2 часа после введения МФТП отмечались выраженные изменения поведения животных в тесте «вращающийся стержень», которые проявлялись в нарушении координации движений и уменьшении времени удерживания на стержне при постоянной скорости вращения. Через 7 суток после введения МФТП у животных продолжало наблюдаться нарушение координации движений, что выражалось в уменьшении времени удерживания на стержне в режиме вращения с ускорением. Гимантан при внутрибрюшинном введении в дозах 10 и 20 мг/кг и при внутривенном введении в дозе 5 мг/кг значительно улучшал координацию движений и достоверно увеличивал время удерживания мышей с ПС на стержне. Мидантан в дозе 20 мг/кг (внутрибрюшинно) в данном тесте оказывал сходный с гимантаном эффект (табл. 5).

При оценке поведения мышей в тесте «вертикальный стержень» через 90 минут после введения МФТП выявлены значительные нарушения, выражавшиеся в увеличении времени поворота и спуска по стержню. Внутрибрюшинное введение гимантана в дозе 20 мг/кг и внутривенное в дозе 5 мг/кг приводило к достоверному снижению времени, необходимого животным для поворота и спуска,

Таблица 5

Влияние гимантана в инъекционной форме на моторную активность мышей C57BL/6 с МФТП вызванным паркинсоническим синдромом в тесте «вращающийся стержень»

Вещества, дозы, способ введения	Время удержания на стержне, с	
	Вращение с постоянной скоростью — 10 об./мин (1 е сутки)	Вращение с ускорением от 10 до 30 об./мин (7 е сутки)
Контроль интактный	191,4±11,53	167,8±9,0
МФТП (30 мг/кг) в/б	33,6±9,88#	78,0±5,83#
Гимантан (10 мг/кг) в/б + МФТП	56,4±2,37*	138,67±9,90*
Гимантан (20 мг/кг) в/б + МФТП	47,3±7,52	104,2±18,27*
Гимантан (5 мг/кг) в/в + МФТП	60,5±9,20*	97,67±6,58*
Мидантан (20 мг/кг) в/б + МФТП	49,65±8,34	136,0±22,19*

Примечание: # — $p < 0,01$ в сравнении с группой интактного контроля;

* — $p < 0,05$ — относительно группы получавшей только МФТП (по критерию Манна-Уитни)

при этом эффект внутривенного введения был несколько выше (табл. 6).

Полученные результаты свидетельствуют о способности гимантана в инъекционной лекарственной форме при внутрибрюшинном и внутривенном введении уменьшать ригидность и олигокинезию у мышей C57BL/6, вызванную однократным введением МФТП в дозе 30 мг/кг.

Таблица 6

Влияние гимантана в инъекционной лекарственной форме на координацию движений у мышей C57BL/6 с МФТП вызванным паркинсоническим синдромом в тесте «вертикальный стержень»

Вещества, дозы, способ введения	Через 2 часа после введения МФТП	
	Время поворота, с	Время спуска, с
Контроль интактный	2,0±0,55	9,6±1,3
МФТП (30 мг/кг) в/б	73,8±23,2#	82,2±19,4#
Гимантан (20 мг/кг) в/б + МФТП (30 мг/кг) в/б	17,8±4,04#*	30,0±8,7#*
Гимантан (5 мг/кг) в/в + МФТП (30 мг/кг) в/б	21,5±11,8#*	48,3±14,3#*

Примечание: # — $p < 0,01$, в сравнении с группой интактного контроля;

* — $p < 0,05$ — относительно группы получавшей только МФТП (по критерию Манна-Уитни)

Моделирование акинетического криза проводили введением галоперидола в малой дозе мышам C57BL/6 с ПС, индуцированным введением МФТП [12].

Введение галоперидола в малой дозе (0,1 мг/кг) на фоне нейротоксина МФТП вызывало выраженную катаlepsию у всех животных. Гимантан в дозе 5 мг/кг (внутривенно) эффективно устранял акинетическое состояние, достоверно уменьшал вре-

мя застывания мышей в «позе лектора», особенно выраженное через 120 минут после введения галоперидола (табл. 7).

Таблица 7

Влияние гимантана в инъекционной лекарственной форме на катаlepsию у мышей C57BL/6 вызванную введением галоперидола (0,1 мг/кг) на фоне МФТП (за 48 часов)

Вещества, дозы, способ введения	Время застывания мышей в позе «лектора», с	
	60 мин после введения Галоперидола	120 мин после введения Галоперидола
Контроль интактный	2,6±1,67	23,6±11,75
МФТП (30 мг/кг) в/б + Галоперидол (0,1 мг/кг) в/б	14,83±4,41#	96,5±13,67#
Гимантан (5 мг/кг) в/в + МФТП + Галоперидол	9,6±5,68	34,4±21,69*

Примечание: # — $p < 0,01$, в сравнении с группой интактного контроля;

* — $p < 0,05$ — относительно группы получавшей только МФТП (по критерию Манна-Уитни)

ПС у крыс моделировали интранигральным введением МФТП+. У животных отмечались выраженные моторные нарушения в тесте «вращающийся стержень». Субхроническое 7-ми дневное внутрибрюшинное введение гимантана в инъекционной лекарственной форме в дозе 10 мг/кг приводило к значительному увеличению времени нахождения животных на вращающемся стержне (рис. 1). Полученные результаты подтверждают способность гимантана в инъекционной лекарственной форме снижать выраженность двигательных нарушений при ПС, вызванным внутримозговым введением нейротоксина МФТП+.

Таким образом, выполненные исследования свидетельствуют о том, что гимантан в инъекционной лекарственной форме при однократном и субхроническом парентеральном (внутривенном и внутрибрюшинном) введении обладает выраженным противопаркинсоническим действием. Гимантан по спектру активности и дозам превосходит препарат сравнения мидантан. Гимантан при внутривенном введении эффективен в меньшей дозе, чем при внутрибрюшинном. Эти результаты согласуются с данными исследований фармакокинетики гимантана при различных путях введения [5]. Инъекционная лекарственная форма гимантана обеспечивает быстрое наступление эффекта на моделях ПС, что определяет возможность применения препарата при острых и тяжёлых состояниях у больных с болезнью Паркинсона, когда применение таблетированной формы препарата невозможно, в том числе при акинетических кризах.

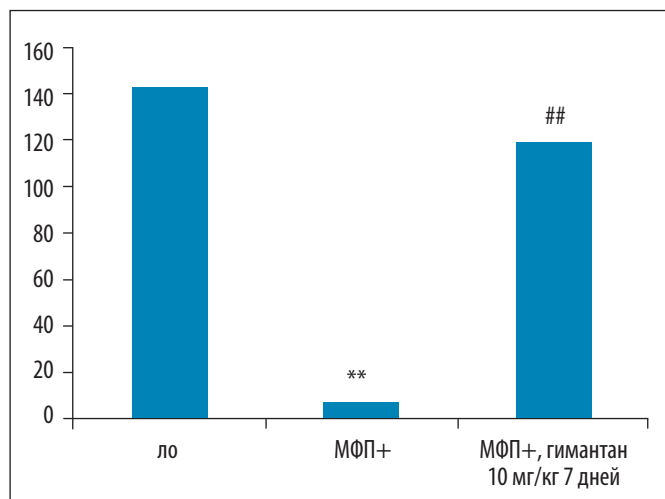


Рис. 1. Влияние гимантана в инъекционной лекарственной форме на поведение животных в тесте «вращающийся стержень»

Примечание: ** — $p < 0,01$, в сравнении с группой ложно-оперированных (ЛО);

— $p < 0,05$ — относительно группы получавшей только МФП+ (по критерию Манна-Уитни)

Основные выводы

1. На модели ареколинового тремора показана дозозависимая антитрemorная активность гимантана в инъекционной лекарственной форме, более выраженная при внутривенном введении (5 мг/кг внутривенно). Препарат

сравнения мидантан не активен в отношении тремора на данной модели.

2. На модели галоперидоловой катаlepsии гимантан в инъекционной лекарственной форме при внутрибрюшинном и внутривенном (5 мг/кг) введении обладает выраженным антикатаlepsогенным действием, превосходящим активность мидантана.

3. На модели МФТП вызванного паркинсонического синдрома у мышей C57Bl/6 гимантан в инъекционной лекарственной форме при парентеральном введении снижает нарушения двигательной активности, регистрируемые в тестах «открытое поле», «вращающийся стержень» и «вертикальный стержень».

4. На модели акинетического состояния, вызванного введением низкой дозы галоперидола (0,1 мг/кг) животным с паркинсоническим синдромом, индуцированным нейротоксином МФТП, гимантан (5 мг/кг внутривенно) проявляет выраженные антикатаlepsический и антиакинетический эффекты.

5. Гимантан в инъекционной лекарственной форме при субхроническом внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг снижает двигательные нарушения, вызванные у крыс внутримозговым введением нейротоксина МФП+.

Литература

1. Вальдман Е. А. Разработка фармакологического средства патогенетической терапии паркинсонизма на основе анализа механизмов действия производных аминоксантамина. Автореф. дисс... докт. мед. наук. М. 2001. 44 с.
2. Вальдман Е. А., Воронина Т. А., Неробкова Л. Н. Противопаркинсоническая активность нового производного адмантана. Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999. № 4. С. 37.
3. Воронина Т. А., Вальдман Е. А., Неробкова Л. Н. Методические указания по изучению антипаркинсонической активности фармакологических веществ // В кн.: Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ. Ред. Р. У. Хабриев, изд. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, М. Медицина. 2005. С. 295-307.
4. Катунина Е. А., Петрухова А. В., Авакян Г. Н., Неробкова Л. Н., Воронина Т. А., Саядян Х. С. Возможности применения гимантана при лечении болезни Паркинсона. Журнал неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова. 2008. Т. 108, № 6. С. 24-27.
5. Литвин Е. А., Бастрыгин Д. В., Колыванов Г. Б., Алексеев К. В., Жердев В. П. Фармакокинетика гимантана у крыс. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2011. № 11. С. 24-28.
6. Неробкова Л. Н., Вальдман Е. А., Воронина Т. А., Маркина Н. В., Шаркова Л. М. Влияние нового производного аминоксантамина А 7 на проявления паркинсонического синдрома, вызванного системным введением нейротоксина МФТП. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2000. № 3. С. 36.
7. Сергеева М. С., Грушевская Л. Н., Пятин Б. М., Авдюнина Н. И., Гаевая Л. М., Клумова В. С., Дуденкова М. Е., Алексеев К. В. Фармацевтический анализ и стандартизация инъекционной лекарственной формы гимантана. Химико-фармацевтический журнал. 2011. № 8. С. 49-52.
8. Федорова Н. В., Грачев И. С. Леводопамининдуцированные дискинезии при болезни Паркинсона: эффективность амантадина сульфата. Неврологический журнал. 2009. № 1. С. 43-48.
9. Федорова Н. В., Чигирь И. П., Кула Т. К. Алгоритм лечения развернутых стадий болезни Паркинсона // Атмосфера. Нервные болезни. 2006. № 1. С. 20-26.
10. Danielczyk W. 1995. Twenty five years of amantadine therapy in Parkinson's disease. J. Neural Transm. Suppl. 1995. Vol. 46. P. 399-405.
11. Ogawa N., Hirose Y., Ohara S., Ono T., Watanabe Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP treated mice. // Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1985. Vol. 50, (3). P. 435-441.

11. *Przedborski S., Vila M.* The 1 methyl 4 phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine mouse model. A tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003. Vol. 991. P. 189-198.
12. *Pettifer K. M., Jiang S., Bau C., Ballerini P., D'Alimonte I., Werstiuk E. S., Rathbone M. P.* MPP⁺ induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine. *Purinergic Signal.* 2007. Vol. 4. P.399-409.
13. *Tillerson J. L., Miller G. W.* Grid performance test to measure behavioral impairment in the MPTP treated mouse model of parkinsonism. *J Neurosci Methods.* 2003. Vol. 123, (2). P. 189-200.
14. *Watanabe Y., Himeda T., Araki T.* Mechanisms of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. *Med. Sci. Monit.* 2005. Vol.11, (1). P. 17-23.
15. *Weihmuller F. B., Hadjiconstantinou M., Bruno J. P.* Dissociation between biochemical and behavioral recovery in MPTP treated mice // *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 1989. Vol. 34 (1). P.113–117.

Изучение фармакодинамики наноразмерной формы феназепама на основе поли (бутил) цианоакрилатных наночастиц

*Балабаньян В. Ю.¹, Разживина В. А.¹, Максименко О. О.², Кондрахин Е. А.³,
Ковалев Г. И.³, Воронина Т. А.³*

¹ — ООО «Технология лекарств», Химки, Московская область

² — ООО «НПК «Наносистема», Москва

³ — ФГБУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» РАМН, Москва

Резюме

Поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы с феназепамом получали методом полимеризации 2-п-бутилцианоакрилата в кислой среде в присутствии стабилизаторов. Размеры наночастиц составили 230–250 нм, степень включения феназепама — 65%. В опытах на экспериментальных животных (крысы, мыши) установлено, что феназепам, включённый в наночастицы, покрытые полисорбатом 80, оказывает выраженное анксиолитическое, антиагрессивное и противосудорожное действие, аналогичное действию феназепама в субстанции, однако, в отличие от феназепама в субстанции, в терапевтических дозах (0,1–2,0 мг/кг, в/в) не обладает седативным и миорелаксантным действием. Анксиолитическое действие наноразмерной формы феназепама ослабляется флумазенилом и бикикуллином. Изучена возможность прямого влияния наноформы феназепама на связывание [N-метил-³H]-флунизепам мембранами гиппокампа крыс. Установлены количественные параметры рецепторного связывания феназепама, включённого в поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы.

Ключевые слова: феназепам, поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы, рецепторное связывание, апополипротеины плазмы крови, нанофармакология, наноформа, фармакодинамика, анксиолитик

Введение

Феназепам — отечественный анксиолитик из группы производных бензодиазепаина, широко применяющийся в лечебной практике как анксиолитическое, седативное, снотворное и противосудорожное средство уже более 25 лет. Вместе с тем наличие побочных эффектов, выражающихся в ухудшении моторных и мнестических функций, риске возникновения лекарственной зависимости и синдрома отмены, существенно лимитирует применение феназепама в клинической и, особенно, амбулаторной практике. Уменьшить или устранить побочные эффекты феназепама представляется возможным при создании его наноразмерной формы на основе полимерных наночастиц из поли (бутил) цианоакрилата. К настоящему времени можно считать доказанным, что при включении лекарственных веществ (ЛВ) в наночастицы существенно меняется профиль распределения ЛВ, повышается эффективность и продолжительность действия, а также снижаются побочные эффекты и токсичность [1–8].

Экспериментальная часть

Получение поли (бутил) цианоакрилатных наночастиц (ПБЦА НЧ) с феназепамом и определение их физико-химических характеристик

В исследовании использовали мономер бутилцианоакрилата (Sicomet 6000, Sichel-Werke, Hannover, Germany). Наночастицы получали методом кислотной полимеризации в среде, содержащей в качестве стабилизатора декстран (мМ 70 кДа) в 0,1М растворе соляной кислоты. К раствору феназепама (76,7 мг) в хлористом метиле (2,27 г) добавили 180 мкл бутилцианоакрилата. Для достижения полного растворения бутилцианоакрилата использовали перемешиватель Vortex (VWR International, Германия) и ультразвуковую баню. Полученный раствор количественно переносили в водную фазу (36,8 мг безводной лимонной кислоты; 2,35 г полоксамера 188; 20,65 мл воды) и подвергали ультразвуковой гомогенизации на гомогенизаторе (Ultra-Turrax T18 basic, Германия) в течение 1 минуты. Суспензию перемешивали на магнитной

мешалке (Labtex Daihan, Корея) в течение 3 часов для удаления органического растворителя и полимеризации мономера, после чего фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» и лиофилизировали (лиофильная сушка Alpha 2–4 LSC Christ, Германия). В качестве криопротектора использовали маннит. Размер частиц определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии (наносайзер Nanosizer NanoZS, Malvern Instruments, Великобритания). Содержание феназепама в наночастицах определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Helios Zeta UV–VIS, Thermo Scientific, США). Перед введением животным лиофильно высушенные наночастицы ресуспендировали в 0,9% растворе натрия хлорида, а затем инкубировали в течение часа с 1% раствором полисорбата 80 (ПС 80).

Изучение фармакологических эффектов феназепама, включённого в ПБЦА НЧ

Опыты проведены на самцах белых нелинейных крыс массой 250–280 г и самцах белых беспородных мышей массой 23–28 г. (питомник «Столбовая» РАМН). Животных содержали в виварии в стандартных клетках при температуре 18–20 °С при свободном доступе к пище и воде.

Анксиолитическое действие веществ изучали в тесте приподнятого крестообразного лабиринта [9]. Методика приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) основана на естественной боязни открытого пространства, новизне обстановки и страха падения с высоты [10]. Мышь помещали на центральную площадку лабиринта и в течение 3-х мин регистрировали: число выходов и длительность пребывания в открытых рукавах, число свешиваний с открытых рукавов и выходов в закрытые рукава.

Антиагрессивное действие феназепама исследовали в тесте «драки» животных [9]. Мышей парами высаживали на электродный пол и раздражали постепенно увеличивающимся по силе прерывистым электротоком до возникновения драки. Регистрировали напряжение тока, при котором у животных возникала драка.

Седативное действие оценивали с помощью метода «открытого поля» в опытах на крысах и мышах. Регистрировали в течение 3-х мин число пересечённых квадратов, вертикальных стоек и обследованных отверстий.

Миорелаксантное действие веществ изучали с помощью метода вращающегося стержня (rota rod) со скоростью вращения 3 об/мин в эксперименте на крысах и мышах.

Противосудорожное действие оценивали в двух тестах. В тесте антагонизма с коразолом изучали способность феназепама предупреждать тонико-

клонический компонент судорожного припадка у крыс, вызванного коразолом (70 мг/кг, п/к). Влияние веществ на первично-генерализованную эпилептиформную активность по показателям ЭЭГ оценивали в течение 30-ти минут после введения бемегида (10 мг/кг в/нб). Регистрировали длительность судорожных разрядов и число разрядов за минуту [9].

Изучение влияния флумазенила и бикикуллина на анксиолитический эффект феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы

Исследования проводили в опытах на крысах в тесте конфликтной ситуации. Феназепам, включённый в ПБЦА наночастицы, вводили группе животных внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг. Затем, с 15-минутным интервалом этим же крысам вводили флумазенил (внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг) и через 15 минут оценивали анксиолитическое действие, регистрируя количество наказуемых взятий воды. Феназепам, включённый в матрикс ПБЦА наночастиц, вводили группе животных (внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг), затем сразу же вводили бикикуллин (внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг). Через 30 минут оценивали различие анксиолитического действия между этой группой животных и контрольными группами.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с помощью компьютерной программы BioStat for Windows. Достоверность различий оценивали с помощью вышеуказанной программы с использованием критериев Стьюдента и Фишера (при $p \leq 0,05$).

Изучение рецепторного связывания феназепама, включённого в ПБЦА НЧ с бензодиазепиновыми рецепторами (БДЗ-рецепторы) мозга в условиях in vitro и ex vivo

Приготовление мембран. Исследуемых животных декапитировали, извлекали головной мозг, отделяли гиппокамп, гомогенизировали в 16 мл ледяного (0–4 °С) 50 mM Tris-HCl буфера (pH 7,4) используя гомогенизатор тефлон-стекло. Полученную суспензию центрифугировали при 42 000 g в течение 25 мин в ультрацентрифуге Optima L-70K (Beckman Coulter). После центрифугирования супернатант сливали, осадок ресуспендировали повторной гомогенизацией в том же объёме буфера, затем вновь центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный осадок ресуспендировали в 20 мл Tris-HCl буфера и использовали по 250 мкл в процедуре связывания [N-метил-³H]-флунитразепама.

Процедура радиолигандного связывания. Полученную мембранную фракцию головного мозга

инкубировали с [N-метил- ^3H] -флунитразепамом (удельная активность 81 Ки/ммоль) в течение 30 мин при температуре 0–4 °С. Неспецифическое связывание определяли в присутствии избытка немеченого феназепама (20 мкМ). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Процесс связывания останавливали путём добавления ледяного буфера и быстрой фильтрацией через стекловолоконные фильтры типа GF/B (Whatman) с последующей двукратной промывкой ледяным буфером общим объёмом 8 мл.

Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия. Фильтры высушивали в течение 12 часов при комнатной температуре, затем помещали в сцинтилляционную жидкость (реактив Брея) объёмом 5 мл и использовали для сцинтилляционного счёта. Радиоактивность каждой пробы измеряли в течение 2 мин на сцинтилляционном счётчике PerkinElmer 2900TR. Эффективность счёта составляла более 45%. Неспецифическое связывание составляло не более 10% от общего.

Анализ радиорецепторного связывания. Для обработки результатов радиолигандного связывания и построения кривых связывания радиоактивного лиганда использовали программу *Graphpad Prism 4 Demo*. При анализе насыщения и получения характеристик связывания B_{max} (величина отражает количество мест связывания лиганда на соответствующих рецепторах в исследуемой структуре мозга) и K_d (отражает аффинитет лиганда к местам связывания на рецепторном комплексе) измеряли специфическое связывание в диапазоне концентраций меченого лиганда от 0.01 до 20 нМ. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Неспецифическое связывание определяли в присутствии немеченого лиганда (20 мкМ). Для построения кривых вытеснения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 3-х повторностях. Результаты представлены в виде «mean±S.E.M».

Результаты исследования

Получение ПБЦА НЧ с феназепамом. Наночастицы были приготовлены методом кислотной полимеризации в среде, содержащей

декстран 70000 в качестве стабилизатора. Показано, что оптимальная скорость перемешивания при полимеризации — 500 об/мин, оптимальным стабилизатором является декстран-70 в диапазоне концентраций от 0,5 до 2,5%. Выявлена зависимость между уровнем pH полимеризационной среды и размерами ПБЦА НЧ — размер ПБЦА НЧ увеличивается при снижении pH от 3 до 1,9. Показано, что наносуспензия с феназепамом остаётся стабильной в течение 24 часов.

Методом фотонной корреляционной спектроскопии установлено, что размеры ПБЦА НЧ с феназепамом лежат в пределах от 230 до 250 нм. Включение феназепама в НЧ составило 65%.

Изучение фармакологических эффектов феназепама, включённого в ПБЦА НЧ, в сравнении с феназепамом в субстанции. Анксиолитическое действие было изучено в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) в опытах на мышах. Установлено, что феназепам в субстанции оказывал отчётливый дозозависимый анксиолитический эффект (табл. 1). В дозе 0,1 мг/кг он увеличивал время, проведённое в открытых рукавах в 6,3 раза, в дозе 0,5 мг/кг — в 7,9 раза и в дозе 1,0 мг/кг — в 11,2 раза (рис. 1).

НаноФен также оказывал выраженный, зависимый от дозы анксиолитический эффект (табл. 1). В дозе 0,1 мг/кг (внб) он увеличивал время, проведённое в открытых рукавах в 7,6 раза, в дозе 0,5 мг/кг — в 10,9 раза и в дозе 1,0 мг/кг — в 13,7 раза (рис. 1).

Таким образом, по выраженности анксиолитического эффекта НаноФен даже несколько превос-

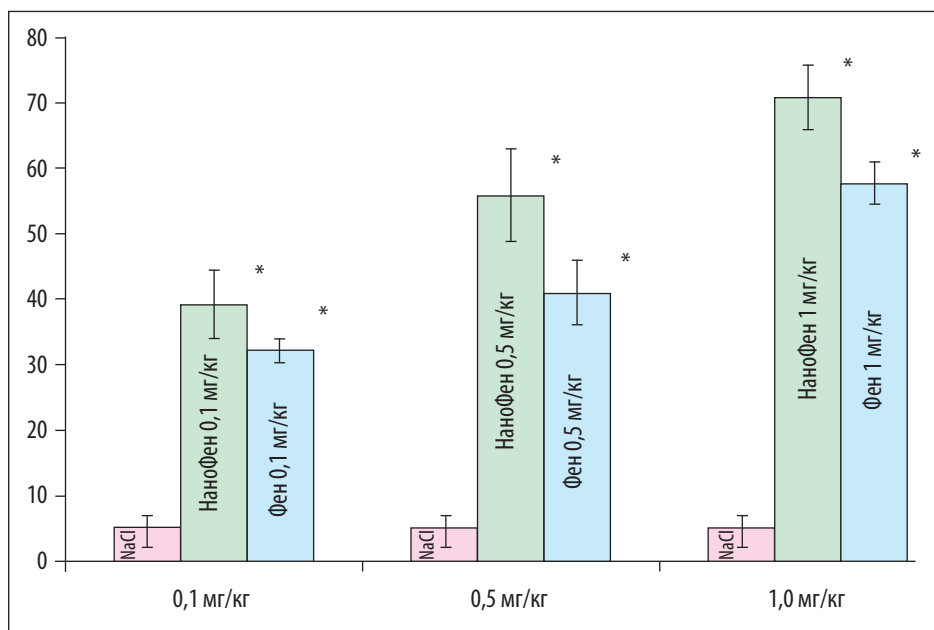


Рис. 1. Анксиолитическое действие феназепама, включенного в матрикс ПБЦА наночастиц (НаноФен), в сравнении с феназепамом в субстанции в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах

* — различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

Таблица 1

Анксиолитическое действие феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы (НаноФен), в сравнении с феназепамом в субстанции (Фен-Субс), в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах

Вводимые вещества	Число выходов в открытые рукава	Время в открытых рукавах (сек.)	Число свешиваний	Число выходов в закрытые рукава
Контроль (NaCl)	0,43±0,09	5,14±1,78	0,29±0,12	2,29±0,1
НаноФен (0,1 мг/кг, вnb)	2,53±0,16*	39,16±5,18*	2,11±0,24*	1,1±0,09*
Фен-Субс (0,1 мг/кг, вnb)	3,27±0,48*	32,3±3,16*	2,66±0,61*	0,64±0,18*
НаноФен (0,5 мг/кг, вnb)	2,73±0,18*	55,86±7,14*	2,12±0,47*	1,3±0,22*
Фен-Субс (0,5 мг/кг, вnb)	2,57±0,48*	41,1±5,17*	2,06±0,52*	1,1±0,21*
НаноФен (1 мг/кг, вnb)	2,57±0,89*	70,86±4,84*	2,29±0,52*	1,28±0,41*
Фен-Субс (1 мг/кг, вnb)	2,43±0,75*	57,8±6,77*	1,86±0,41*	1,28±0,41*

Примечание: * — различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

ходит феназепам в субстанции, однако, различия не носят достоверного характера.

Антиагрессивное действие было изучено в тесте немотивированной агрессивности — «драки» на электродном полу в опытах на мышах. При использовании феназепама в субстанции в дозе 2 мг/кг порог болевой реакции животных увеличился в 1,9 раз, а порог агрессивной реакции — в 1,6 раз (табл. 2).

Таблица 2

Антиагрессивное действие феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы (НаноФен) и феназепама в субстанции (Фен-Субс) в тесте «драки» у мышей

Показатели поведения	Контроль (NaCl)	НаноФен (2 мг/кг, вnb)	Фен-Субс (2 мг/кг, вnb)
Порог болевой реакции	6,13±1,73	23,5±6,18*	11,88±4,22*
Порог агрессивной реакции	22,5±4,96	38,8±4,51*	36,5±1,29*
Порог судорожной реакции	25,5±1,93	40,13±1,29*	31,88±1,81*

Примечание: * — различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

НаноФен в дозе 2 мг/кг увеличивал порог болевой реакции животных в 3,8 раз, а порог агрессивности — в 1,72 раза (табл. 2) и, таким образом, не уступал феназепаму в субстанции по антиагрессивному действию.

При изучении противосудорожного действия установлено, что феназепам в субстанции и НаноФен в 100% случаях блокировали судороги, вызванные коразолом, в то время как в контрольной группе при введении аналогичной дозы коразола у 90% крыс наблюдались тонико-клонические судороги.

После введения бемегида в дозе 10 мг/кг в сенсомоторной коре, дорзальном гиппокампе и латеральном гипоталамусе регистрировались эпилептиформные разряды высокоамплитудных острых и медленных волн, амплитудой более 200 мкВ,

длительностью от 0,3 до 2,5 сек. (рис. 2). Число разрядов за минуту составило в среднем 12,3±4,6, а длительность разрядов за минуту — 6,1±0,4. НаноФен почти полностью устранял первично-генерализованные судороги (рис. 3) и значительно увеличивал латентное время появления эпилептиформных разрядов. Число разрядов в минуту составило 1,1±0,07, т.е. в 11 раз меньше, чем в контроле, а длительность 0,45±0,07, т.е. в 13 раз меньше, чем в контроле.

Феназепам в субстанции также ослаблял эффекты бемегида: число разрядов за минуту снижалось до 3,2±0,5, а длительность до 0,5±0,08. Таким образом, можно отметить, что противосудорожная активность НаноФен была несколько выше, чем у феназепама в субстанции.

При изучении седативного эффекта под влиянием феназепама в субстанции в дозе 1 мг/кг наблюдалось существенное уменьшение, по сравнению с контролем, числа пересечённых мышами квадратов (в 7 раз), количества вертикальных стоек (в 5 раз) и количества обследованных отверстий (в 15 раз) в открытом поле, что свидетельствует о его выраженном седативном действии. НаноФен практически не вызывал снижения числа пересечённых квадратов и числа вертикальных стоек (табл. 3).

Таблица 3

Седативный эффект феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы (НаноФен), и феназепама в субстанции (Фен-Субс) в тесте «открытое поле» в опытах на мышах в дозе 1 мг/кг

Показатели поведения	Контроль (NaCl)	НаноФен (1 мг/кг, вnb)	Фен-Субс (1 мг/кг, вnb)
Горизонтальные перемещения	32,5±3,96	37,24±3,85	4,59±1,6*
Вертикальные стойки	6,29±1,78	4,24±0,63	1,24±1,25*
Обследованные отверстия	7,12±1,75	6,88±1,45	0,47±0,63*
Число болюсов	1,82±0,21	0,35±0,16*	1,24±0,45

Примечание: * — различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

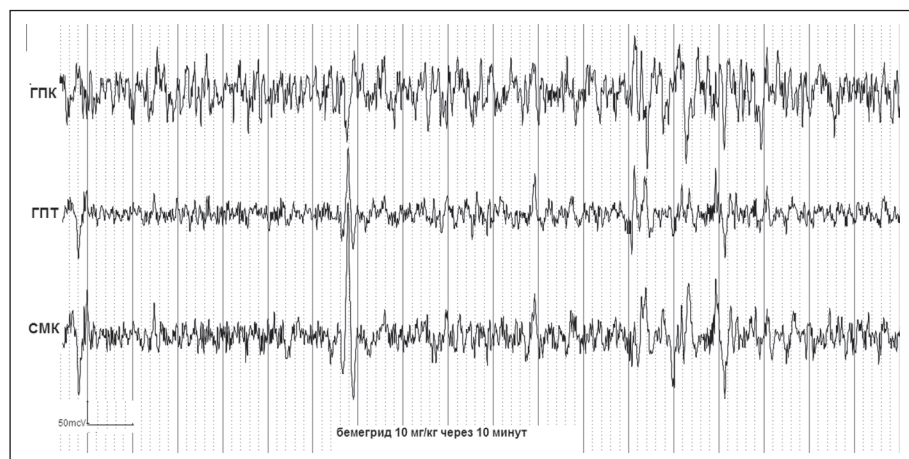


Рис. 2. Электрограммы крысы, зарегистрированные через 10 минут после введения бемегрида

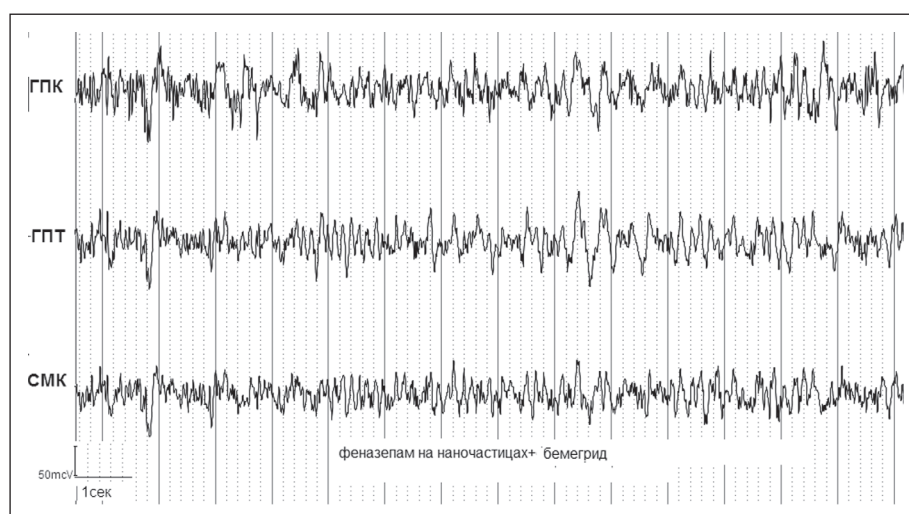


Рис. 3. Электрограммы крысы, зарегистрированные при введении НаноФен и бемегрида

Изучение миорелаксантного действия. В опытах на крысах феназепам в субстанции в дозе 1 мг/кг вызывал падение со стержня 50% крыс с латентным периодом 11,2 с., а в дозе 2 мг/кг — 80% животных с латентным периодом 4,1 с. НаноФен в дозах 1 и 2 мг/кг практически не оказывал миорелаксантного действия: количество крыс, неспособных удержаться на вращающемся стержне при использовании вещества в дозах 1 и 2 мг/кг составило 10%.

В опытах на мышах при использовании феназепама в субстанции в дозе 1 мг/кг наблюдалось падение со стержня 50% мышей с латентным периодом 8,4 с., а в дозе 2,5 мг/кг — 90% животных с латентным периодом 2,8 с. В дозе 5 мг/кг феназепам в субстанции оказывал еще более глубокое миорелаксантное действие. У животных наблюдалось расслабление задних конечностей и 50% животных не были способны перемещаться даже на плоской поверхности (лабораторном столе). НаноФен в дозе 1 мг/кг не вызывал нарушения координации движений и миорелаксантного действия. В дозе 2,5 мг/кг НаноФен вызывал нарушение коорди-

нации движений у 20% мышей при первой посадке и у 10% мышей при второй посадке. В высокой дозе 5 мг/кг НаноФен вызывал нарушение координации движений у 70% мышей.

Таким образом, полученные результаты показали, что феназепам, включенный в ПБЦА наночастицы, обладает выраженным анксиолитическим, антиагрессивным и противосудорожным действием, аналогичным действию феназепама в субстанции, однако, в отличие от феназепама в субстанции, в терапевтических дозах не обладает седативным и миорелаксантным действием.

С целью выяснения вопроса о возможном вовлечении ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса в реализацию анксиолитического действия наноразмерной формы феназепама были использованы фармакологические анализаторы — флумазенил и бикикуллин. Флумазенил — этил-8-фтор-5,6-дигидро-5-метил-6-оксо-4Н-имидазо [1,5-а-1,4] бензодиазепин-3-карбоксилат является конкурентным блокаторм специфических бензодиазепиновых рецепторов

и устраняет все центральные эффекты бензодиазепиновых транквилизаторов: анксиолитический, снотворный, седативный и миорелаксантный, а также способствует восстановлению дыхания и сознания при передозировке бензодиазепинов. Бикикуллин — алкалоид, выделяемый из растения *Dicentra cucullaria*, является антагонистом ГАМК-А рецепторов и снижает центральные эффекты бензодиазепиновых анксиолитиков.

В ходе проведенного исследования установлено, что флумазенил (10 мг/кг, внб), введенный после феназепама (1 мг/кг), достоверно снижает анксиолитический эффект как феназепама в субстанции, так и НаноФен, о чём свидетельствует значительное уменьшение (более чем в 6 раз) числа наказуемых взятий воды по сравнению с показателями одних веществ (рис. 4). Бикикуллин (1 мг/кг, внб) также ослабляет анксиолитический эффект феназепама в субстанции и НаноФен (рис. 4), но его эффект был менее выражен, чем эффект флумазенила. Полученные данные позволяют предположить, что в реализацию анксиолитиче-

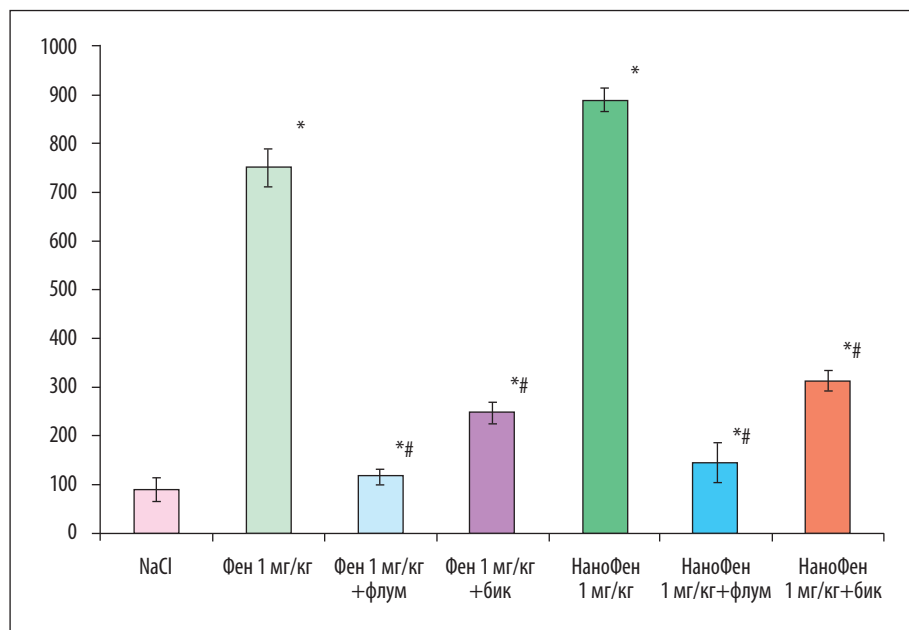


Рис. 4. Влияние флумазенила (флум) в дозе 10 мг/кг и бикикуллина (бик) в дозе 1 мг/кг на анксиолитическое действие феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы в дозе 1 мг/кг, и феназепама в субстанции в дозе 1 мг/кг, в тесте конфликтной ситуации в опытах на крысах

* — различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

— различие с препаратом без антагониста достоверно при $p < 0,05$

ского действия НаноФен также как и в механизм действия феназепама в субстанции, вовлекаются бензодиазепиновые и ГАМК-А рецепторы.

С целью получения доказательных представлений о механизме действия наноразмерной формы феназепама проводили изучение рецепторного связывания феназепама, включённого в ПБЦА НЧ с бензодиазепиновыми рецепторами мозга в условиях *in vitro* и *ex vivo*.

Эксперименты *in vitro*. Результаты сравнения динамики специфического связывания и величин IC_{50} двух серий экспериментов в условиях *in vitro* представлены на рис. 5. Как феназепам, так НаноФен вмешиваются в процесс связывания [N-метил- 3H] -флунитразепама с рецепторами гиппокампа с близкими величинами 2,8 и 6,6 нмоль/л. Полученные данные *in vitro* свидетельствуют о том, что включение феназепама в ПБЦА наночастицы не изменяет способности феназепама специфически связываться с БДЗ-рецепторами мозга.

Эксперименты *ex vivo*. Результаты изучения состояния БДЗ-рецепторов после 5-кратного системного введения феназе-

пама и НаноФен представлены на рис. 6. Эффекты обоих веществ описываются классическими кривыми насыщения, указывающими на монотонное и моноцентрическое связывание лиганда. При этом обе экспериментальные кривые лежат существенно выше, чем в контрольной группе сравнения.

Количественные параметры рецепторного связывания, рассчитанные по программе Graphpad Prism 4 Demo, приведены в табл. 4, из которой следует, что под влиянием субхронического введения изменениям подвергаются обе константы, описывающие состояние БДЗ-рецепторов: во-первых, величины констант диссоциации K_d уменьшаются в обеих группах на 22% ($p < 0.01$), что интерпретируется как возрастание степени структурного сродства рецептора к лиганду ([N-метил- 3H] -флунитразепаму); во-вторых, возрастают величины B_{max} , отражающие плотность мест связывания лиганда. Причём, под влиянием феназепама количество рецепторов увеличивается на 46% ($p < 0.01$), а под воздействием НаноФен — на 70% ($p < 0.01$). При этом действие НаноФен оказывается заметно эффективнее ($p < 0.05$).

Таблица 4

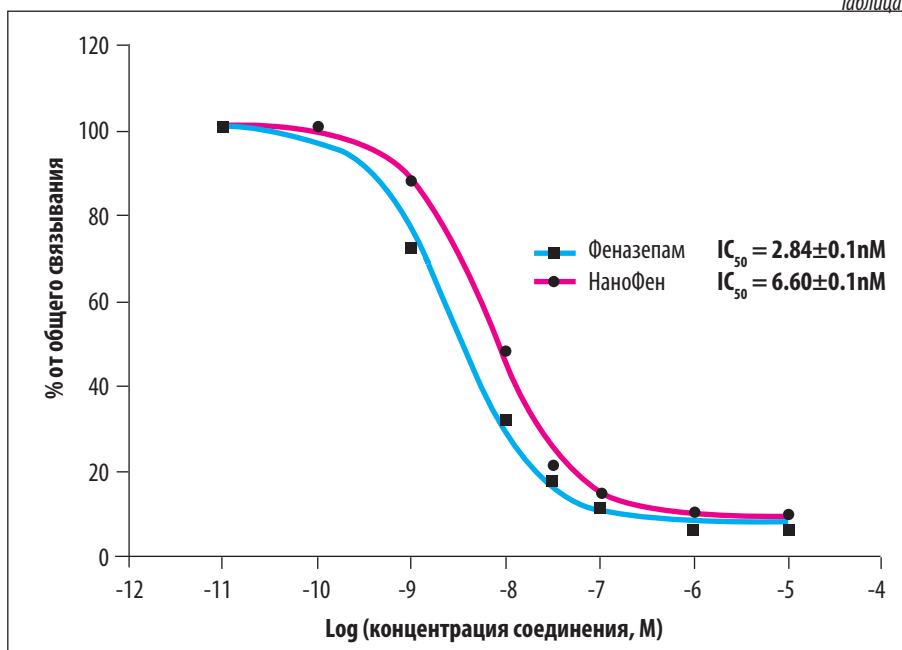


Рис. 5. Влияние феназепама и НаноФен на связывание [N-метил- 3H] -флунитразепама мембранами гиппокампа крыс *in vitro*

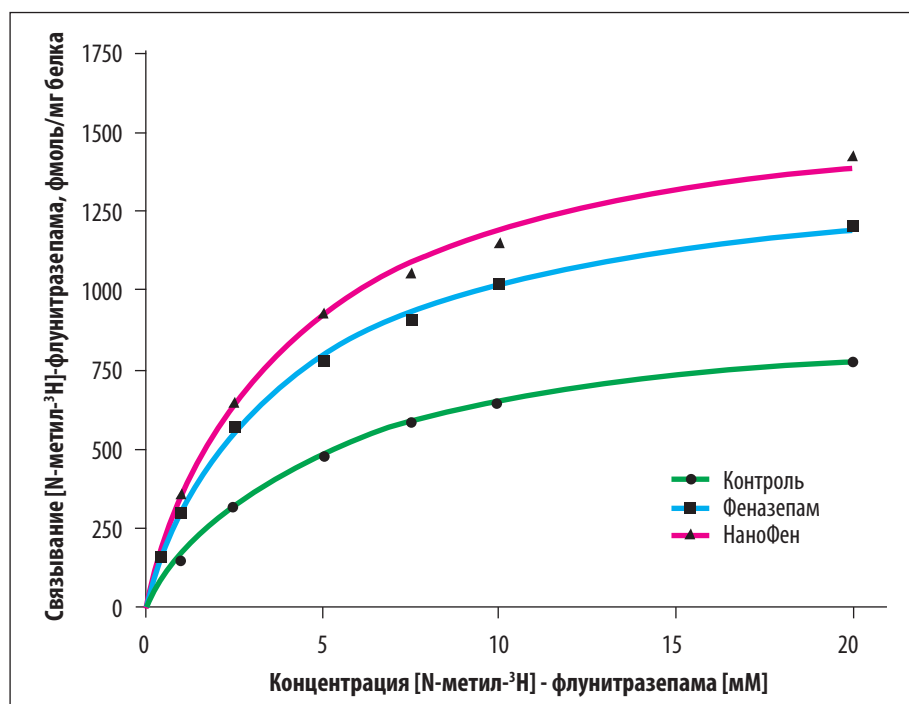


Рис. 6. Сравнительное влияние субхронического введения феназепама (1 мг/кг, 5 дней) и НаноФен (1 мг/кг, 5 дней) на характеристики радиолигандного связывания с мембранами гиппокампа крыс *ex vivo*

Характеристики рецепторного связывания феназепама и НаноФен с БДЗ-рецепторами гиппокампа крыс после субхронического введения (1 мг/кг/день*5) *ex vivo*

Группы	B_{max} , фмоль/мг белка (% к контролю)	K_d , нмоль/л (% к контролю)
Контроль	975±17 (100±2%)	5,02±0,23 (100±5%)
Феназепам	1427±28* (146±3%)	3,94±0,22* (78±4%)
НаноФен	1662±44*/** (170±5%)	3,92±0,30* (78±6%)

Примечания: * — отличие от контроля $p < 0.01$; ** — отличие от феназепама $p < 0.05$

Обсуждение результатов

При изучении спектра фармакологических эффектов феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы, было установлено, что он обладает выраженным анксиолитическим эффектом в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, аналогичным эффекту феназепама в субстанции, который является дозозависимым и усиливается при повышении дозы от 0,1 до 1,0 мг/кг. По выраженности анксиолитического эффекта феназепам, включённый в ПБЦА наночастицы, даже несколько превосходит феназепам в субстанции, однако, различия не носят достоверного характера. Наряду с анксиолитическим эффектом, феназепам, включённый в ПБЦА наночастицы, и фе-

назепам в субстанции обладают сходным антиагрессивным эффектом в тесте «драки» пары мышей на электродном полу и противосудорожным эффектом в тестах антагонизма с коразолом и бемегридом. В тоже время, феназепам, включённый в ПБЦА наночастицы, в сравнении с феназепамом в субстанции, не обладает в терапевтических дозах седативным и миорелаксantным действием. В высокой дозе (5 мг/кг) НаноФен оказывает значительно меньшее миорелаксantное действие (нарушение координации движений у 70% животных), чем феназепам в субстанции (нарушение координации у 100% животных, расслабление задних конечностей и неспособность передвижения даже на плоской поверхности).

Таким образом, феназепам, инкапсулированный в ПБЦА наночастицы, покрытые полисорбатом 80, в сравнении с феназепамом в субстанции, обладает выраженным анксиолитическим, антиагрессивным и противосудорожным действием, аналогичным действию феназепама в субстанции, однако, в отличие от феназепама в субстанции, в терапевтических дозах не обладает седативным и миорелаксantным действием.

Для объяснения вышеуказанных эффектов феназепама, включённого в матрикс ПБЦА, нами были проведены исследования, которые позволяют предположить, что в реализацию анксиолитического действия феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы, также как и в действие феназепама в субстанции, вовлекаются бензодиазепиновые и ГАМК-А рецепторы. Об этом свидетельствует тот факт, что флумазенил — антагонист бензодиазепиновых рецепторов достоверно снижает анксиолитическое действие феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы. Наряду с этим, достоверно снижает анксиолитическое действие феназепама бикакуллин — антагонист ГАМК-А рецепторов. Полученные данные позволяют предположить, что фармакологические эффекты инкапсулированного в наночастицы феназепама реализуются через бензодиазепиновые рецепторы, которые аллостерически связаны с ГАМК-А рецепторами.

Результаты проведённых исследований по изучению рецепторного связывания в условиях *in vitro* подтвердили предположение о том, что действие инкапсулированного в наночастицы фена-

зепам опосредуется через БДЗ-рецепторы. При этом установлено, что поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы не влияют на способность феназепама специфически связываться с БДЗ-рецепторами мозга. Выявленное в экспериментах *ex vivo* существенное возрастание константы B_{max} при субхроническом введении наноформы феназепама свидетельствует об увеличении плотности участков связывания феназепама в структуре БДЗ-рецепторов гиппокампа. Таким образом, некоторое повышение фармакологической активности феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы, можно отчасти объяснить его более полным связыванием с БДЗ-рецепторами мозга.

К настоящему времени можно считать доказанным, что поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы, покрытые полисорбатом 80, способны осуществлять доставку ЛВ в мозг [11–16]. Ключевую роль в этом процессе играют апополипротеины Аро-Е и АроА-1, сорбирующиеся на поверхность частицы из плазмы крови [17, 18]. Наличие апополипротеинов на поверхности наночастиц придаёт им сходство с липопротеинами плазмы крови, что и обеспечивает их рецептор-зависимый эндоцитоз эндотелиоцитами капилляров мозга [19]. Внутри

эндотелиальной клетки частица подвергается биодegradации под действием ферментов и выделяет ЛВ, которое затем диффундирует через мембрану в межклеточное пространство.

В структурах мозга выявлена различная плотность рецепторов к Аро-Е и АроА-1. Показано, что в головном мозге рецепторы к АроЕ и АроА-1 находятся в наибольшем количестве в гиппокампе и коре [20–22]. Эти данные хорошо коррелируют с результатами о том, что именно в гиппокампе, а также в коре и в значительно меньшей степени в других структурах под влиянием нанокапсулированного феназепама происходит усиление спектров мощности ЭЭГ [23].

Учитывая вышеизложенное можно предположить, что феназепам, включённый в ПБЦА наночастицы, доставляется преимущественно в гиппокамп и кору, т.е. в структуры наиболее значимые для проявления анксиолитического эффекта, и в которых плотность рецепторов к АроЕ и АроА-1 максимальна. Этот факт в определённой степени объясняет наблюдаемое расслоение основных и побочных эффектов инкапсулированного в поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы феназепама.

Литература

1. Wohlfart S., Gelperina S., Kreuter J. Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release* 2012. Vol. 161, P. 264–273.
2. Kreuter J., Gelperina S. Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori* 2008. Vol. 94, P. 271–277.
3. Andrieux K., Garcia-Garcia E., Kim H. R., Couvreur P. Colloidal carriers: a promising way to treat central nervous system diseases. *J. Nanoneurosci.* 2009. № 1. P. 17–34.
4. De Juan B. S., Von Briesen H., Gelperina S. E., Kreuter J. Cytotoxicity of doxorubicin bound to poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in rat glioma cell lines using different assays. *J. Drug Target.* 2006. № 14. P. 614–622.
5. Aktas Y., Yemisci M., Andrieux K., et al. Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconjug. Chem.* 2005. № 16. P. 1503–1511.
6. Steiniger S. C., Kreuter J., Khalansky A. S., et al. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer* 2004. Vol. 109, P. 759–767.
7. Wang C. X., Huang L. S., Hou L. B., et al. Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model. *Brain Res.* 2009. Vol. 1261, P. 91–99.
8. Mahajan S. D., Roy I., Xu G., et al. Enhancing the delivery of antiretroviral drug «Saquinavir» across the blood brain barrier using nanoparticles. *Curr. HIV Res.* 2010. Vol. 8. P. 396–404.
9. Воронина Т. А., Середенин С. Б. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия фармакологических веществ. — Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р. У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 253–263.
10. Pellow S. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 1982. Vol. 14. P. 149–167.
11. Alyautdin R., Gothard D., Petrov V., et al. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 1995. Vol. 41. P. 44–48.
12. Alyautdin R. N., Petrov V. E., Langer K., et al. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.* 1997. Vol. 14. P. 325–328.
13. Gulyaev A. E., Gelperina S. E., Skidan I. N., et al. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm. Res.* 1999. Vol. 16. P. 1564–1569.
14. Басел А., Петров В. Е., Балабаньян В. Ю. и др. Транспорт прозерина в головной мозг при помощи полибутилцианоакрилатных наночастиц, покрытых полисорбатом 80. *Рос. мед. журн.* 2006. № 4. С. 28–32.

15. Kurakhmaeva K. B., Djindjikhshvili I. A., Petrov V. E., et al. Brain targeting of nerve growth factor using poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Drug Target.* 2009. Vol. 17. P. 564–574.
16. Балабанян В. Ю., Солев И. Н., Елизарова О. С. и др. Нейропротекторный эффект человеческого рекомбинантного эритропоэтина, сорбированного на полимерных наночастицах, на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (модель геморрагического инсульта). *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2011. № 5. С. 8–13.
17. Kreuter J., Hekmatara T., Dreis S., et al. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J. Control. Release* 2007. Vol. 117, P. 54–58.
18. Zensi A., Begley D., Pontikis C., et al. Human serum albumin nanoparticles modified with apolipoprotein A-I cross the blood–brain barrier and enter the rodent brain// *J. Drug Target.* 2010. Vol. 18. P. 842–848.
19. Kreuter J., Shamenkov, D. Petrov V., et al. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood–brain barrier// *J. Drug Target.* 2002. Vol. 10. P. 317–325.
20. Holtzman D. M., Bales K. R., Tenkova T. et al. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. Vol. 105, P. 2892–2897
21. Irizarry M. C., Cheung B., Rebeck et al. Apolipoproteins affect the amount, form, and anatomical distribution of amyloid — peptide deposition in homozygous APP V717F transgenic mice. *Acta Neuropath.* 2000. Vol. 100, P. 451–458
22. Bales K. R., Verina T., Cummins D. J. et al. Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP V717F transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Vol. 96, 1523–1528
23. Разживина В. А. Изучение эффектов феназепама на поли (бутил) цианоакрилатных наночастицах. — Автореф. дисс. канд. биол. наук. М. 2009. 24 с.

Фармакокинетические свойства нового производного ГАМК цитрокарда: распределение и тканевая биодоступность

Тюрников И. Н., Перфилова В. Н., Смирнова Л. А., Рябуха А. Ф.,
Сучков Е. А., Лебедева С. А.

Волгоградский государственный медицинский университет,
лаборатория фармакологической кинетики

Резюме

При внутривенном и пероральном введении в распределении цитрокарда по органам и тканям прослеживается значительная неоднородность. Соединение имеет наибольшую тропность к органам с высокой степенью васкуляризации — лёгким, селезёнке, сердцу и органам элиминации — печени и почкам. В мышечной ткани, имеющей небольшой уровень кровотока, цитрокард также определяется в высоких концентрациях. В меньшей степени препарат содержится в головном мозге и жировой ткани.

Невысокая проницаемость гематоэнцефалического барьера для цитрокарда, скорее всего, обусловлена низкой липофильностью препарата, что подтверждается его более низкими по отношению к крови концентрациями в сальнике.

Ключевые слова: производные ГАМК, фармакокинетика, тканевая биодоступность, цитрокард

Введение

Одним из важнейших доклинических испытаний новых лекарственных веществ является изучение их фармакокинетических свойств. Данные исследования позволяют изучить процессы всасывания, распределения, метаболизма и выведения лекарственных веществ. Знание процессов распределения позволяет выявить органы и ткани, в которые они проникают наиболее интенсивно и/или в которых удерживаются наиболее длительно, что может способствовать более детальному изучению механизмов действия лекарственных веществ [1–5].

Целью данного исследования явилось изучение распределения в организме и тканевой биодоступности нового производного ГАМК — цитрокарда, обладающего кардио- и церебропротекторными свойствами [6–8]. Доклиническое исследование фармакологических свойств и лекарственной безопасности препарата проведено на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ и в лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств ВолгГМУ.

Методы исследования

Эксперименты выполнены на 150 белых беспородных крысах — самцах массой 180–220 г, которые содержались в условиях вивария на стандартной диете с соблюдением всех правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции

по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.).

Для количественного определения соединений нами был разработан метод ВЭЖХ для определения фенибута и его производных. Использовался жидкостной хроматограф Shimadzu (Япония) с диодно-матричным детектором и колонкой C18 4,6×100 мм, 5 μm. Для приготовления мобильной фазы использовали ацетонитрил (УФ 210) (Россия) и буферную систему, состоящую из однозамещённого фосфата калия 50 мМоль, pH 2.7 (Россия) и натриевой соли гептансульфоновой кислоты (0,12%). Соотношение водной и органической фазы 88:12% v/v. Субстанцию цитрокарда фиксировали при длине волны 205 нм. Чувствительность метода составляет 1 мкг/мл. Экстракцию цитрокарда, а также одновременное осаждение белков из биологических проб производили из плазмы крыс 10% ТХУ в соотношении 1:0,5 [9].

Распределение соединений в организме крыс изучали в органах потенциального действия: сердце и мозг; в тканях с сильной васкуляризацией — лёгких и селезёнке; с умеренной васкуляризацией — мышце (musculus quadriceps femoris) и слабой васкуляризацией — сальнике, а также в органах, обеспечивающих элиминацию — печени и почках. Из органов готовили 20% гомогенаты в дистиллированной воде.

Цитрокард вводили крысам внутривенно и перорально в терапевтической дозе 50 мг/кг. Забор проб крови и органов при внутривенном введении

производили через 5, 10, 20, 40 минут и через 1, 2, 4, 8 и 12 часов, а при пероральном введении — через 15, 30 минут и через 1, 2, 4, 8 и 12 часов после введения.

Для оценки интенсивности проникновения препарата в ткани использовался показатель тканевой доступности (f_t), определяемый отношением значения AUC (площади под фармакокинетической кривой) в ткани к соответствующей величине AUC в крови. Также оценивали кажущийся коэффициент распределения (K_d) препарата между кровью и тканью, определяемый отношением соответствующих концентраций в один и тот же момент времени на конечных (моноэкспоненциальных) участках кривых.

Расчёты производили немодельным методом, статистическую обработку осуществляли в программе Excel.

Результаты исследования

В результате проведённого исследования были получены усреднённые фармакокинетические профили зависимости концентрации соединения в плазме крови крыс от времени. Как видно из представленных данных, максимальная концентрация цитрокарда (134,01 мкг/мл) наблюдается на пятой минуте после введения. Затем происходит быстрое снижение концентрации и через 12 часов исследования содержание соединения в плазме становится ниже порога определения. Снижение носит биэкспоненциальный характер, предполагая быструю первую фазу распределения, сменяющуюся более медленной фазой элиминации. За два часа исследования концентрация цитрокарда снижается почти в 10 раз (на второй час определяется 14,8 мкг/мл плазмы крови). Это свидетельствует о том, что цитрокард подвергается интенсивной элиминации в организме крыс.

Основные фармакокинетические параметры (табл. 1) показывают низкие значения периода полувыведения ($T_{1/2} = 1,85$ часа) и среднего времени удерживания в организме одной молекулы препарата (MRT = 2,36 часа). Среднее по скорости снижение концентрации цитрокарда в плазме крови обуславливает малую величину площади под фармакокинетической кривой ($AUC = 134,018$ мкг*час/мл). Величина стационарного объёма распределения (V_{ss}) равна 0,88 л/кг, показатель незначительно превышает объём экстрацеллюлярной жидкости в организме крысы, что свидетельствует о низкой способности препарата распределяться и накапливаться в тканях. С этим, по-видимому, связано низкое значение показателя системного клиренса ($Cl = 0,37$ л/час*кг), несмотря на выраженность процессов элиминации соединения.

При пероральном введении цитрокард обнаруживается в органах и тканях через 15 минут после введения, достигая максимума через 2 часа и через 12 часов уровень концентрации опускается до порога определения данного лекарственного вещества. Фармакокинетические параметры представлены в табл. 1.

Таблица 1

Фармакокинетические параметры соединения цитрокард в плазме крови крыс при внутривенном и пероральном введении в дозе 50 мг/кг

Параметры	Внутривенное введение	Пероральное введение
AUC (мкг /мл*ч)	134,018	85,77
K_{el} (ч ⁻¹)	0,375	0,16
$T_{1/2}$ (ч)	1,849	5,67
MRT (ч)	2,36	0,58
Cl (л/ (час × кг))	0,373	3,31
V_{ss} (л/кг)	0,882	4,43

При пероральном введении цитрокарда картина распределения становится иная. Значительно увеличивается период полувыведения и объём распределения изучаемого вещества.

В сердце, органе потенциального действия при внутривенном введении, соединение обнаруживается в максимальной концентрации (24,69 мкг/г) через 5 минут после введения, в течение 20 минут показатель удерживается на этом же уровне, а затем незначительно снижается к 40 минутам, определяясь до 8 часа. Фармакокинетический профиль цитрокарда в сердце совпадает с таковым в плазме крови. Тканевая доступность составляет 0,671; коэффициент распределения — 1 (табл. 2). При пероральном введении тканевая биодоступность возрастает на 30% и составляет 0,978, коэффициент распределения остаётся на том же уровне как и при внутривенном введении (табл. 3).

Препарат в невысоких концентрациях проникает через гематоэнцефалический барьер в головной мозг. Максимальное количество (6,31 мкг/г) цитрокарда в мозге определяется на пятой минуте и сохраняется выше порога определения в течение 4 часов. Тканевая доступность составляет 0,089; коэффициент распределения — 0,134. При пероральном введении уровень цитрокарда в мозге находится ниже порога определения табл. 2 и 3).

В селезёнке и лёгких отмечается сходная тенденция при обоих путях введения. Тканевая доступность составляет 0,75 для лёгких и 1,09 для селезёнки; коэффициент распределения — 1,097 и 1,493, соответственно при внутривенном введении (табл. 2). Тканевая биодоступность при пероральном введении у этих органов одинаковая (1,35 и 1,37), коэффициент распределения составляет 0,759 для селезёнки и 0,885 для лёгких (табл. 3).

Таблица 2

Фармакокинетические параметры распределения соединения цитрокард в органах и тканях при внутривенном введении крысам в дозе 50 мг/кг

Орган	AUC (мкг/мл×ч)	ft	K _d
Сальник	57,62	0,43	0,664
Мозг	11,88	0,089	0,134
Мышцы	153,2	1,143	1,755
Сердце	89,94	0,671	1,005
Почки	543,1	4,053	4,486
Печень	179,7	1,341	1,041
Селезёнка	146,2	1,091	1,493
Лёгкие	101	0,753	1,097

Таблица 3

Фармакокинетические параметры распределения соединения цитрокард в органах и тканях при пероральном введении крысам в дозе 50 мг/кг

Орган	AUC (мкг/мл×ч)	ft	K _d
Сальник	73,68	0,859	0,621
Мозг	—	—	—
Мышцы	80,85	0,943	0,677
Сердце	83,87	0,978	1,052
Почки	449,71	5,243	3,878
Печень	89,72	1,046	1,002
Селезёнка	115,63	1,348	0,759
Лёгкие	117,52	1,37	0,885

В мышечной ткани цитрокард определяется на уровне органов с высокой степенью васкуляризации при обоих путях введения. Максимальная концентрация (58,1 мкг/г) наблюдается на 10 минуте, тканевая доступность составляет 1,143 коэффициент распределения — 1,755 при внутривенном введении (табл. 2) и при пероральном введении тканевая доступность — 0,943, коэффициент распределения — 0,677 (табл. 3).

В сальнике цитрокард обнаруживается в достаточно высоких концентрациях при внутривенном введении (52,7 мкг/г) и в очень невысоких при пероральном введении (6 мкг/г). Тканевая доступность равна 0,43 при внутривенном введении и 0,86 при пероральном; коэффициент распределения — 0,664 и 0,621, соответственно (табл. 2 и 3).

Тканевая доступность цитрокарда для печени и почек составляет 1,341 и 4,053, коэффициент распределения — 1,041 и 4,486, соответственно (табл. 2). Данные значения фактически не отличаются от таковых при пероральном введении (табл. 3), что свидетельствует о наличии высоких концентраций препарата в органах элиминации. Снижение количества вещества в печени и почках происходит аналогично таковому в плазме крови.

Таким образом, распределение цитрокарда по органам и тканям осуществляется по следующей схеме: наибольшее содержание отмечается в почках, как при пероральном, так и при внутривенном введении. Это подтверждается и высокими значениями почечного клиренса, который составляет при внутривенном введении 80%, а при пероральном введении 60% от тотального клиренса. Цитрокард хорошо распределяется

и в органы с высокой степенью васкуляризации, где его тканевая доступность выше единицы. Содержание цитрокарда в сердце сопоставимо с его содержанием в крови, при этом тканевая биодоступность для сердца выше приблизительно в 1,5 раза при пероральном введении, по сравнению с внутривенным. Содержание цитрокарда в сальнике также зависит от пути введения. При пероральном введении тканевая биодоступность в 2 раза выше, чем при внутривенном, и составляет 86 и 43% от содержания его в крови, соответственно. Наименьшее содержание цитрокарда отмечается в мозге. Тканевая биодоступность при внутривенном введении составляет 8,9% от его содержания в кровотоке. При пероральном введении концентрации соединения в мозге ниже порога определения. Тогда как у аналога цитрокарда — фенибута концентрации в мозге при внутривенном введении составляет 9%, при пероральном — 100% [10].

Основные выводы

1. В результате проведённых исследований установлено, что распределение цитрокарда в органы и ткани носит неоднородный характер. Наибольшую тропность изучаемое соединение имеет к органам с высокой степенью васкуляризации и органам элиминации.
2. В мозге крыс соединение определяется в низких концентрациях, что, скорее всего, связано с транспортом через гематоэнцефалический барьер и не связано с липофильностью цитрокарда и высокой степенью васкуляризации мозга.

Литература

1. Каркищенко Н. Н., Хоронько В. В., Сергеева С. А., Каркищенко В. Н. Фармакокинетика. Феникс, Ростов-на-Дону; 2001.
2. Жердев В. П., Бойко С. С., Месонжик Н. В., Анполонова С. А. Экспериментальная фармакокинетика препарата дилепт. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009. Т. 72, № 3, С. 16–21.
3. Спасов А. А., Смирнова Л. А., Иёжица И. Н. и др. Фармакокинетика производных бензимидазола. Вопросы медицинской химии. 2002. Т. 48, № 3, С. 233–258.
4. Бойко С. С., Колыванов Г. Б., Жердев В. П. и др. Экспериментальное исследование фармакокинетики триптофансодержащего дипептида ГБ-115. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. Т. 144, № 9, С. 285–287.
5. Бастрыгин Д. В., Виглинская А. О., Колыванов Г. Б. и др. Фармакокинетика соединения М-11 у крыс. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010. Т. 74, № 7, С. 22–26.
6. Тюренков И. Н., Перфилова В. Н., Бородкина Л. Е., Гречко О. Ю., Ковтун В. В. Кардио- и церебропротекторное действие новых структурных аналогов ГАМК. Вестник Волгоградской медицинской академии. 2000, № 6, С. 52–56.
7. Перфилова В. Н., Тюренков И. Н., Писарев В. Б. и др. Морфофункциональная оценка кардиопротекторного действия производных ГАМК в условиях хронической алкогольной интоксикации. Бюлл. ВНЦ РАМН и АВО. 2008, № 1, С. 16–21.
8. Бородкина Л. Е., Воронков А. В., Багметов М. Н. и др. Влияние новых производных фенибута на мнестическую функцию и ориентировочно-исследовательское поведение животных в условиях хронической алкоголизации. Вестник Волгоградской медицинской академии. 200, № 39. С. 46–49.
9. Тюренков И. Н., Перфилова В. Н., Смирнова Л. А. и др. Разработка хроматографического метода количественного определения фенибута в биологических пробах. Химико-фармацевтический журнал. 2010. Т. 44, № 12, С. 68–70.
10. Тюренков И. Н., Перфилова В. Н., Смирнова Л. А. и др. Фармакокинетические свойства фенибута при внутривенном и пероральном введении. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2010. № 9, С. 22–25.

Биоэквивалентность капсулированных форм пипемидовой кислоты у добровольцев

Алтынбеков С. А.¹, Джолдыгулов Г. А.¹, Серяков В. Н.¹,
Будач Я. М.², Курилов О.², Жердев В. П.³

¹ — РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ РК, г. Алматы, Казахстан

² — АО «Химфарм», Казахстан

³ — ФГБУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова» РАМН, Москва, Россия

Резюме

В рамках перекрёстного, однократного, открытого, рандомизированного исследования с периодом отмычки 1 неделя, с двумя последовательностями на 18 добровольцах изучена биоэквивалентность капсул пипемидовой кислоты двух производителей (доза 400 мг). Концентрацию пипемидовой кислоты в образцах плазмы крови определяли методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием в течение 24 часов. Для исследуемых препаратов рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , t_{max} , C_{max}/AUC . 90% доверительный интервал отношений $AUC_{0-\infty}$ сравниваемых препаратов составил 0,926–1,095 и для C_{max} — 0,914–1,067. В дополнение к 90% доверительным интервалам, двусторонний дисперсионный анализ не выявил статистически значимых различий между изучаемыми препаратами. Сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов пипемидовой кислоты.

Ключевые слова: пипемидовая кислота, биоэквивалентность.

Введение

Пипемидовая кислота (8-Этил-5,8-дигидро-5-оксо-2- (1-пиперазинил) пиридо [2,3-d] пиримидин-6-карбоновая кислота) является одним из наиболее активных препаратов для лечения инфекций мочевыводящих путей. Препарат обладает широким спектром активности и хорошими фармакокинетическими свойствами.

В связи с высокой чувствительностью возбудителей пиелонефрита к пипемидовой кислоте для его лечения в последние годы с успехом используется уроантисептик Палин (фирмы LEK) и Пимидель (фирмы KRKA), которые назначают по 0,4 г 2 раза в сутки [1].

Удобство применения, точность дозирования, высокая биодоступность, эстетичность, лёгкость воспроизводства щадящих технологических приёмов — некоторые из преимуществ капсул как лекарственной формы, которые важны и для создания препаратов группы уроантисептиков, в том числе и пипемидовой кислоты.

Цель исследования

Целью настоящей работы являлось исследование биоэквивалентности двух препаратов пипемидовой кислоты: Уропалин, капсулы 200 мг, АО «Химфарм», Республика Казахстан и Пимидель®, капсулы, 200 мг, производства «КРКА, д.д. Ново Место», Словения.

Материалы и методы

Методом отбора к исследованию были допущены 14 женщин и 4 мужчин ($32,5 \pm 10,4$ лет; $62,4 \pm 8,5$ кг; $164,4 \pm 6,9$ см). В случайном порядке добровольцы принимали вначале 2 капсулы (400 мг) тестируемого препарата (Уропалин, капсулы 200 мг, АО «Химфарм», Республика Казахстан; тест-препарат; Т) [1-й период исследования], а затем, спустя 7 дней — 2 капсулы (400 мг) референс-препарата (Пимидель®, капсулы, 200 мг, производства «КРКА, д.д. Ново Место», Словения; препарат сравнения; R) [2-й период исследования]. В обратном порядке добровольцы вначале принимали 2 капсулы препарата Пимидель [1-й период исследования], а затем спустя 7 суток — 2 капсулы Уропалина [2-й период исследования]. Препараты принимали внутрь, не разжёвывая, запивая 200 мл воды. Взятие образцов крови для определения содержания пипемидовой кислоты в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени — до принятия препарата (0) и через 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 10,0 и 24,0 ч после приёма препаратов.

Определение концентраций пипемидовой кислоты в плазме крови добровольцев проводили методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [3]. Предел количественного определения пипемидовой кислоты составил 2,5 нг/мл.

Оценка биоэквивалентности проводилась применительно к параметрам площади под фар-

макокинетической кривой пипемидовой кислоты в плазме крови добровольцев от нуля до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) и максимальной концентрации пипемидовой кислоты в плазме крови (C_{max}) (натуральные и логарифмически преобразованные данные) с использованием методов параметрической статистики.

В статье представлены результаты работы анализа вариации ANOVA для показателей биоэквивалентности $\ln AUC_{0-\infty}$ и $\ln C_{max}$. Условием применения является предположение о нормальном распределении изучаемых показателей.

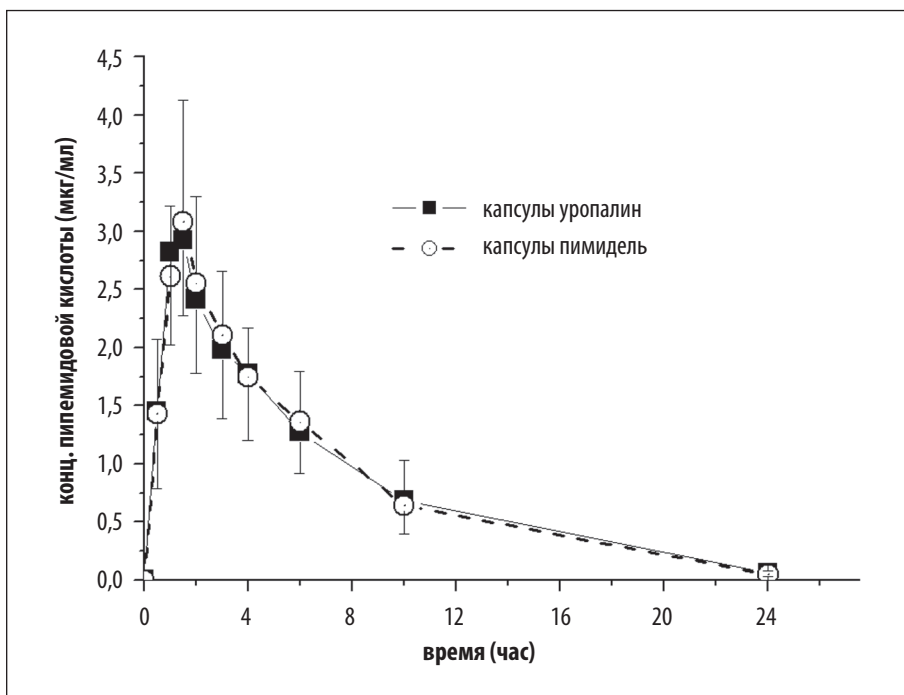
В качестве рабочей была принята нулевая гипотеза: между средними значениями показателей биоэквивалентности тест-препарата и препарата сравнения отсутствуют статистически значимые различия.

В качестве источников вариации изучались межиндивидуальные различия, обусловленные испытуемыми, которые принимали исследуемые препараты («испытуемые»), лекарственной формой препарата («препарат») и последовательностью приёма препаратов («последовательность»).

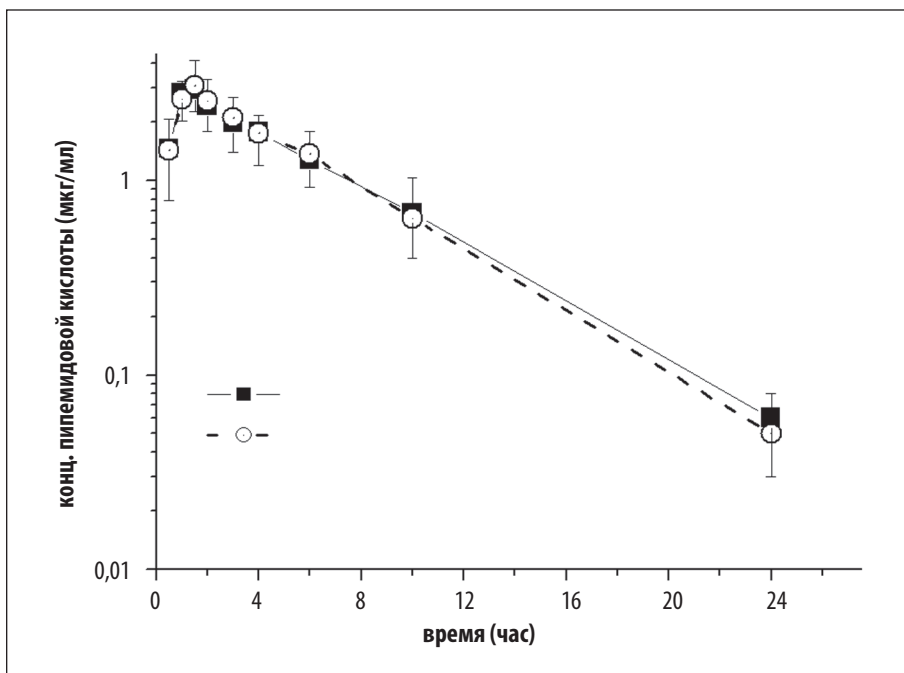
Гипотеза биоэквивалентности принималась, когда 90% доверительный интервал для отношения среднего значения ($\mu T/\mu R$) логарифмически преобразованных данных AUC , составлял $0,8 < \mu T/\mu R < 1,20$, для C_{max} и C_{max}/AUC $0,7 < \mu T/\mu R < 1,43$. Границы, этих интервалов, рассчитывались при помощи дисперсионного анализа ANOVA. Расчёт 90% доверительных интервалов проводили с использованием программы «Kinetic» v. 5.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Расчёт фармакокинетических параметров анализируемых препаратов был проведён с использованием модельно-независимого метода. В табл. 1 приведены средние арифметические значения ($\bar{X}$), соответствующие им стандартные отклоне-

ния (SD) и стандартные ошибки среднего значения ($S_{\bar{X}}$), коэффициенты вариации (C.V.%), размах — непараметрический параметр статистики (разность между максимальным и минимальным значениями ряда) и среднее геометрическое ($\bar{x}_{geom.}$).



а



б

Рис. 1. Усредненные фармакокинетические профили пипемидовой кислоты в плазме крови добровольцев после однократного приема 400 мг, капсул Уропалина (тест-препарат) и 400 мг капсул Пимидель (референс-препарат): (n=18; $\bar{x} \pm SD$) [а] натуральные; б) полулогарифмические оси координат]

Таблица 1

Фармакокинетические параметры пипемидовой кислоты у добровольцев после однократного приема 400 мг исследуемых препаратов

Параметры	AUC _{0-∞} (мкг/мл×ч)		C _{max} (мкг/мл)		t _{max} (ч)		C _{max} /AUC (ч ⁻¹)	
	T	R	T	R	T	R	T	R
$\bar{x}$	20,83	20,72	3,22	3,30	1,2	1,3	0,163	0,167
SD	5,17	5,98	0,58	0,86	0,2	0,3	0,035	0,042
S $\bar{x}$	1,22	1,41	0,14	0,20	0,1	0,1	0,008	0,010
C.V.%	24,82	28,85	18,05	25,93	20,80	25,72	21,27	25,38
Размах	19,52	18,37	2,20	2,63	0,5	1,0	0,121	0,187
$\bar{x}_{\text{geom}}$	20,21	19,91	3,16	3,20	1,1	1,3	0,160	0,163

Рассчитывали парные t-критерии Стьюдента в предположении отсутствии влияния периода получения препарата и нормального распределения изучаемого показателя.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены усреднённые фармакокинетические профили пипемидовой кислоты в плазме крови добровольцев после однократного приёма 400 мг капсул Уропалин и Пимидель, где анализируемое лекарственное вещество определяется на протяжении 24 часов.

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 1) пипемидовой кислоты из капсул Уропалин и Пимидель показал, что изучаемые препараты всасываются из желудочно-кишечного тракта практически с одинаковой скоростью. Так параметр, характеризующий скорость всасывания — $C_{\text{max}}/AUC_{0-\infty}$ для капсул Уропалина составил $0,163 \pm 0,035 \text{ ч}^{-1}$, и для капсул Пимидель — $0,167 \pm 0,042 \text{ ч}^{-1}$ (между сравниваемыми параметрами статистически значимые отличия не обнаружены). Время достижения максимальной концентрации (t_{max}) пипемидовой кислоты в плазме крови добровольцев незначительно отличалось для сравниваемых препаратов и составило в среднем для тест-препарата $1,2 \pm 0,2 \text{ ч}$ и референс-препарата — $1,3 \pm 0,3 \text{ час}$. При этом средняя максимальная концентрация пипемидовой кислоты, определяемая в плазме крови добровольцев (C_{max}), составила для капсул Уропалин — $3,22 \pm 0,58 \text{ мкг/мл}$ и для капсул Пимидель — $3,30 \pm 0,86 \text{ мкг/мл}$.

Анализ основного параметра, характеризующего степень и скорость биодоступности действующего вещества из лекарственной формы — $AUC_{0-\infty}$ указывает на достаточно высокую вариабельность данного параметра (около 29%). Среднее значение $AUC_{0-\infty}$ для препарата Уропалин составило $20,40 \pm 5,13$ и для Пимидель — $20,40 \pm 5,85 \text{ мкг/мл} \times \text{ч}$. При этом не выявлено достоверно значимых различий для сравниваемых величин.

Степень относительной биологической доступности пипемидовой кислоты из капсул Уропалин по отношению капсулам Пимидель, определяемая отношением соответствующих значений $AUC_{0-\infty}$, составила в среднем $102,60 \pm 19,47\%$ (усреднённые данные на основании точечных индивидуальных оценок, см. табл. 2).

Таблица 2

Точечная оценка индивидуальных отношений параметров, характеризующих относительную биодоступность (f') пипемидовой кислоты из капсул Уропалин и Пимидель (Т-тест/R-референс)

№ / №	AUC _{0-∞} -ratio	C _{max} -ratio	C _{max} /AUC-ratio
1	71,15	87,53	122,52
2	110,18	149,58	136,21
3	110,78	115,20	104,03
4	148,78	83,65	56,29
5	113,34	83,22	73,68
6	107,79	125,43	116,06
7	86,14	114,90	133,33
8	122,39	75,10	61,70
9	96,08	113,92	118,90
10	97,00	84,20	87,23
11	107,95	100,33	92,78
12	110,46	115,31	104,40
13	102,72	84,66	82,39
14	88,64	84,81	95,56
15	98,57	117,08	119,02
16	60,96	94,51	154,78
17	95,73	92,94	96,86
18	118,11	85,43	72,38
$\bar{x}$	102,60	100,43	101,56
SD	19,47	19,71	26,88
S $\bar{x}$	4,59	4,65	6,34
C.V.%	18,98	19,63	26,47

Доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений $AUC_{0-\infty}$ составил 0,927–1,095 (или 92,7–109,5%). Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений C_{max} , составила $100,43 \pm 19,71\%$, а доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений C_{max} — 0,914–1,067 (или 91,4–106,7%). Полученные данные представлены в табл. 3.

Таблица 3

90% доверительные интервалы отношения среднего значения ($\mu T/\mu R$) $AUC_{0-\infty}$ и C_{max} (логарифмически преобразованные данные), полученные на основе дисперсионного анализа (ANOVA)

Параметр	Нижнее значение	Верхнее значение
$AUC_{0-\infty}$	0,927	1,095
C_{max}	0,914	1,067

 $\ln AUC_{0-t}$

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,001	1	0,001	0,02514
Последовательность	0,018	1	0,018	0,88562
Добровольцы	2,227	17	0,131	6,45127
Остаточная вариация	0,325	16	0,020	—
Общая вариация	2,570	35	—	—

 $\ln C_{max}$

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,001	1	0,001	0,08229
Последовательность	0,015	1	0,015	0,87480
Добровольцы	1,485	17	0,087	4,95339
Остаточная вариация	0,282	16	0,018	—
Общая вариация	1,784	35	—	—

Полученные доверительные интервалы лежат в пределах, установленных «Оценкой биоэквивалентности лекарственных средств (Методические рекомендации)» и «Проведением надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в Республике Казахстан» [2, 3], что говорит о биоэквивалентности исследуемых препаратов.

Литература

1. Мухин Н. А. Профилактическая нефрология и образ жизни современного человека. Тер. архив. 1993. № 6. С. 4–7.
2. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств (Методические рекомендации), Москва, 2008, с.32.
3. Проведение надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в Республике Казахстан, Астана, 2007, с. 44.
4. Klinge E., Mannisto P. T., Mantyla R. et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of pipemidic acid in normal human volunteers. Antimicrob. Agents and Chemother. 1984, Vol. 26, P. 69–73.

Биоэквивалентность таблетированных форм триметазидина у добровольцев

Алтынбеков С. А.¹, Джолдыгулов Г. А.¹, Серяков В. Н.¹,
Будащ Я. М.², Курилов О.², Колыванов Г. Б.³

¹ — РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ РК, г. Алматы, Казахстан

² — АО «Химфарм»; Казахстан

³ — ФГБУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова» РАМН, Москва, Россия

Резюме

В рамках перекрёстного, однократного, открытого, рандомизированного исследования с периодом отмычки 1 неделя, с двумя последовательностями на 18 добровольцах изучена биоэквивалентность таблеток, покрытых оболочкой, триметазидина двух производителей (доза 20 мг). Концентрацию триметазидина в образцах плазмы крови определяли методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием в течение 24 часов. Для исследуемых препаратов рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , t_{max} , C_{max}/AUC . 90% доверительный интервал отношений $AUC_{0-\infty}$ сравниваемых препаратов составил 0,903–1,013 и для C_{max} — 0,917–1,048. В дополнение к 90% доверительным интервалам, двусторонний дисперсионный анализ не выявил статистически значимых различий между изучаемыми препаратами. Сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов триметазидина.

Ключевые слова: триметазидин, биоэквивалентность, Трикорзидин, Триметазидин-Ратифарм

Введение

В последнее время наблюдается заметный интерес к метаболическому направлению в лечении ишемической болезни сердца и стабильной стенокардии. С одной стороны, этот подход позволяет избежать неблагоприятных последствий при увеличении доз гемодинамических активных средств (нитраты, β -блокаторы, антагонисты кальция) ввиду снижения артериального давления, брадикардии и т.д. С другой стороны, метаболически действующие препараты (триметазидин) потенциально могут сохранить жизнеспособность миокарда (гибернирующий миокард) до проведения операции по восстановлению коронарного кровотока. Эти данные были получены в ряде исследований с использованием метода стресс-эхокардиографии у больных с документированным коронарным атеросклерозом и гибернацией миокарда [3].

Дженерик должен быть эквивалентен оригиналу по фармакокинетическим и фармакодинамическим параметрам, обеспечивая при этом более низкую стоимость, что делает его доступным для большего числа пациентов с хроническим инвалидизирующим заболеванием.

Цель исследования

Целью настоящей работы являлось исследование биоэквивалентности двух препаратов триметазидина: Трикорзидин, таблетки, покрытые

оболочкой, 20 мг, и Триметазидин-Ратифарм® таблетки, покрытые оболочкой, 20 мг.

Материалы и методы

Методом отбора к исследованию были допущены 15 женщин и 3 мужчин (29,5±9,1 лет; 62,2±8,2 кг; 164,4±5,7 см). В случайном порядке добровольцы принимали вначале 1 таблетку (20 мг) тестируемого препарата (Трикорзидин, таблетки, покрытые оболочкой, 20 мг, АО «Химфарм», Республика Казахстан; тест-препарат; Т) [1-й период исследования], а затем, спустя 7 дней — 1 таблетку (20 мг) референс-препарата (Триметазидин-Ратифарм® таблетки, покрытые оболочкой, 20 мг, производства «Меркле» ГмбХ, Германия; препарат сравнения; R) [2-й период исследования]. В обратном порядке добровольцы вначале принимали 1 таблетку препарата Триметазидин-Ратифарм® [1-й период исследования], а затем спустя 7 суток — 1 таблетку Трикорзида [2-й период исследования]. Препараты принимали внутрь, не разжевывая, запивая 200 мл воды. Взятие образцов крови для определения содержания триметазидина в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени — до принятия препарата (0) и через 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12,0 и 24,0 ч после приёма препаратов.

Определение концентраций триметазидина в плазме крови добровольцев проводили методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [4].

В качестве дериватирующего агента использовали 9-флуоренилметилхлорформат (97%) (FMOC-Cl). Предел количественного определения триметазида составил 2,5 нг/мл.

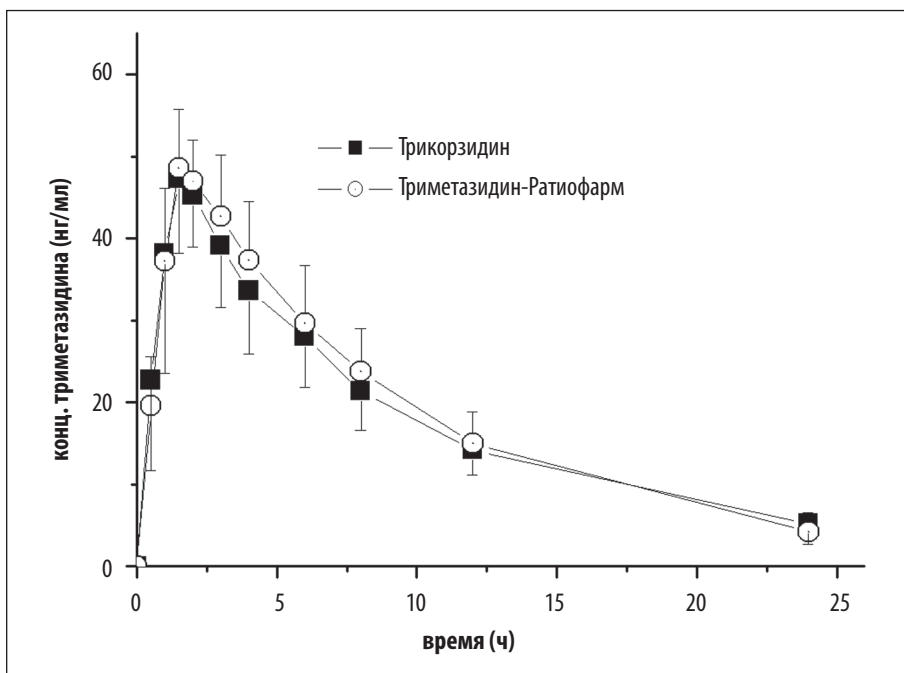
Оценка биоэквивалентности проводилась применительно к параметрам площади под фармакокинетической кривой триметазида в плазме крови добровольцев от нуля до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) и максимальной концентрации триметазида в плазме крови (C_{max}) (натуральные и логарифмически преобразованные данные) с использованием методов параметрической статистики.

В статье представлены результаты работы анализа вариации ANOVA для показателей биоэквивалентности $\ln AUC_{0-\infty}$ и $\ln C_{max}$. Условием применения является предположение о нормальном распределении изучаемых показателей.

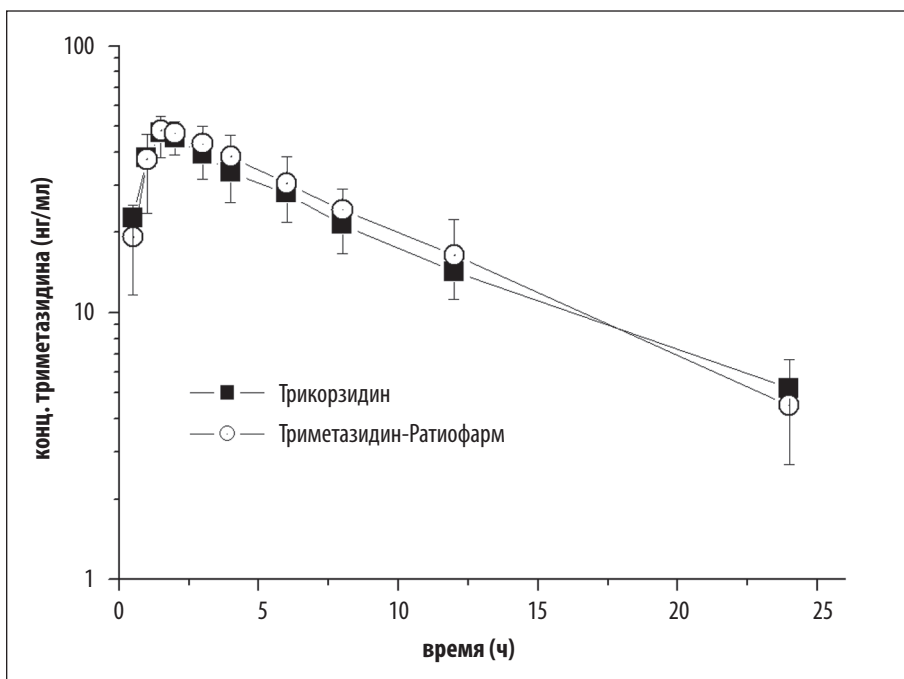
В качестве рабочей была принята нулевая гипотеза: между средними значениями показателей биоэквивалентности тест-препарата и препарата сравнения отсутствуют статистически значимые различия.

В качестве источников вариации изучались межиндивидуальные различия, обусловленные испытуемыми, которые принимали исследуемые препараты («испытуемые»), лекарственной формой препарата («препарат») и последовательностью приёма препаратов («последовательность»).

Гипотеза биоэквивалентности принималась, когда 90% доверительный интервал для отношения среднего значения ($\mu T/\mu R$) логарифмически преобразованных данных AUC , составлял $0,8 < \mu T/\mu R < 1,20$, для C_{max} и C_{max}/AUC $0,7 < \mu T/\mu R < 1,43$. Границы, этих интервалов, рассчитывались при помощи дисперсионного анализа ANOVA. Расчёт 90% доверительных интервалов проводили с использованием программы «Kinetics» v. 5.0 (Thermo Fisher Scientific, США).



а



б

Рис. 1. Усредненные фармакокинетические профили триметазида в плазме крови добровольцев после однократного приёма 20 мг, таблеток, покрытых оболочкой, Трикорзидина (тест-препарат) и 20 мг таблеток, покрытых оболочкой, Триметазидин-Ратиофарм (референс-препарат): (n=18; $\bar{x} \pm SD$) [а] — натуральные; б) — полулогарифмические оси координат]

Расчёт фармакокинетических параметров анализируемых препаратов был проведен с использованием модельно-независимого метода. В табл. 1 приведены средние арифметические значения ($\bar{x}$), соответствующие им стандартные отклонения (SD) и стандартные ошибки среднего значе-

Таблица 1

Фармакокинетические параметры триметазида у добровольцев после однократного приёма 20 мг исследуемых препаратов

Параметры	AUC _{0-t} (нг/мл×ч)		C _{max} (нг/мл)		t _{max} (ч)		C _{max} /AUC (ч ⁻¹)	
	T	R	T	R	T	R	T	R
$\bar{x}$	442,34	462,09	52,72	52,50	1,64	1,75	0,120	0,118
SD	77,04	77,21	7,84	5,21	0,48	0,55	0,019	0,025
S $\bar{x}$	18,17	18,21	1,85	1,23	0,11	0,13	0,005	0,006
C.V.%	17,42	16,71	14,88	9,92	29,24	31,38	16,00	21,67
Размах	257,49	357,72	26,40	16,20	2,00	2,00	0,058	0,104
$\bar{x}_{\text{геом.}}$	436,27	456,22	52,13	52,26	1,58	1,68	0,118	0,116

ния (S $\bar{x}$), коэффициенты вариации (C.V.%), размах — непараметрический параметр статистики (разность между максимальным и минимальным значениями ряда) и среднее геометрическое ($\bar{x}_{\text{геом.}}$).

Рассчитывали парные t-критерии Стьюдента в предположении отсутствии влияния периода получения препарата и нормального распределения изучаемого показателя.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 — представлены усреднённые фармакокинетические профили триметазида в плазме крови добровольцев после однократного приёма 20 мг таблеток Трикорзидин и Триметазидин-Ратиофарм, где анализируемое лекарственное вещество определяется на протяжении 24 часов.

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 1) триметазида из таблеток Трикорзидин и Триметазидин-Ратиофарм показал, что изучаемые препараты всасываются из желудочно-кишечного тракта практически с одинаковой скоростью. Так параметр, характеризующий скорость всасывания — C_{max}/AUC_{0-t} для таблеток Трикорзида составил 0,120±0,019 ч⁻¹, и для таблеток Триметазидин-Ратиофарм — 0,118±0,025 ч⁻¹ (между сравниваемыми параметрами статистически значимые отличия не обнаружены). Время достижения максимальной концентрации (t_{max}) триметазида в плазме крови добровольцев незначительно отличалось для сравниваемых препаратов и составило в среднем для тест-препарата 1,64±0,48 ч и референс-препарата — 1,75±0,55 ч. При этом средняя максимальная концентрация триметазида, определяемая в плазме крови добровольцев (C_{max}), составила для таблеток Трикорзидин — 52,72±7,84 нг/мл и для таблеток Триметазидин-Ратиофарм — 52,50±05,21 нг/мл.

Анализ основного параметра, характеризующего степень и скорость биодоступности действующего вещества из лекарственной формы —

AUC_{0-t} указывает на умеренную вариабельность данного параметра (не выше 18%). Среднее значение AUC_{0-t} для препарата Трикорзидин составило 442,34±77,04 и для Триметазидин-Ратиофарм — 462,09±77,21 нг/мл×ч. При этом не выявлено достоверно значимых различий для сравниваемых величин.

Таблица 2

Точечная оценка индивидуальных отношений параметров, характеризующих относительную биодоступность (f) триметазида из таблеток Трикорзидин и Триметазидин-Ратиофарм (Т-тест/R-референс)

№/№	AUC _{0-t} -ratio	C _{max} -ratio	C _{max} /AUC-ratio
1	0,744	0,909	1,221
2	0,854	0,983	1,151
3	0,924	1,032	1,117
4	1,112	1,288	1,158
5	0,763	1,026	1,344
6	0,921	0,934	1,014
7	0,914	1,079	1,181
8	1,066	0,928	0,870
9	0,942	0,734	0,779
10	1,064	1,078	1,014
11	1,415	1,167	0,606
12	0,990	1,308	1,322
13	0,959	0,987	1,029
14	0,915	0,804	0,879
15	0,927	1,203	1,297
16	1,086	0,971	0,894
17	0,904	0,938	1,038
18	0,892	0,800	0,897
$\bar{x}$	0,966	1,009	1,045
SD	0,150	0,159	0,200
S $\bar{x}$	0,035	0,038	0,047
C.V.%	15,50	15,80	19,10

Степень относительной биологической доступности триметазидина из таблеток Трикорзидин по отношению таблеткам Триметазидин-Ратиофарм, определяемая отношением соответствующих значений AUC_{0-t} , составила в среднем $96,60 \pm 15,0\%$ (усредненные данные на основании точечных индивидуальных оценок, табл. 2).

Доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} составил $0,903-1,013$ (или $90,3-101,3\%$). Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений C_{max} , составила $100,9 \pm 15,9\%$, а доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений C_{max} — $0,917-1,048$ (или $91,7-104,8\%$). Полученные данные представлены в табл. 3.

Таблица 3

90% доверительные интервалы отношения среднего значения ($\mu T/\mu R$) AUC_{0-t} и C_{max} (логарифмически преобразованные данные), полученные на основе дисперсионного анализа (ANOVA)

Параметр	Нижнее значение	Верхнее значение
AUC_{0-t}	0.90288	1.01285
C_{max}	0.91741	1.04807

ln AUC_{0-t}

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0.018	1	0.018	1.84435
Последовательность	0.024	1	0.024	2.44571
Добровольцы	0.769	17	0.045	4.63858
Остаточная вариация	0.156	16	0.010	—
Общая вариация	0.967	35	—	—

ln C_{max}

Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0.003	1	0.003	0.26483
Последовательность	0.000	1	0.000	0.00012
Добровольцы	0.359	17	0.021	1.61603
Остаточная вариация	0.209	16	0.013	—
Общая вариация	0.572	35	—	—

Полученные доверительные интервалы лежат в пределах, установленных «Оценкой биоэквивалентности лекарственных средств (Методические рекомендации)» и «Проведением надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в Республике Казахстан» [1, 2], что говорит о биоэквивалентности исследуемых препаратов.

Литература

1. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств (Методические рекомендации), Москва, 2008, с.32.
2. Проведение надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в Республике Казахстан, Астана, 2007, с. 44.
3. Belardinelli R., Pucaro A. Effects of trimetazidine on the contractile response of chronically dysfunctional myocardium to low-dose dobutamine in ischemic cardiomyopathy. Eur. Heart. J. 2001, Vol. 22, P. 2164–2170.
4. Khedr A., Sheha M. M., Darwish I. A. Sensitive determination of trimetazidine in spiked human plasma by HPLC with fluorescence detection after pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. J. Chromatogr. B., 2007, Vol. 856, P. 337–342.

Исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Кардиоприл и Моноприл®

Сариев А.К.¹, Абаимов Д.А.¹, Ширяева М.В.¹, Прохоров Д.И.¹, Алтынбеков С.А.²,
Джолдыгулов Г.А.², Серяков В.Н.², Будац Я.М.³, Курилов О.³

¹ — ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН, Москва, Россия

² — РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ РК, Казахстан

³ — АО «Химфарм», Казахстан

Резюме

В рамках перекрёстного, однократного, открытого, рандомизированного исследования с однонедельным периодом отмывки, с двумя последовательностями была изучена биоэквивалентность двух таблетированных форм фозиноприла на 18 добровольцах (дозировка 20 мг). Образцы плазмы крови анализировали валидированным методом ВЭЖХ-МС/МС в течение 48 часов. Для анализируемых препаратов рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: AUC_{0-t} , C_{max} , t_{max} , C_{max}/AUC . 90 % доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} составил 0,9393–1,1473 и для C_{max} — 0,8861–1,066. По результатам исследования был сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов фозиноприла.

Ключевые слова: Кардиоприл, Моноприл, фозиноприл, фозиноприлат, фармакокинетика, биоэквивалентность

Введение

Одним из представителей третьего поколения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) является фозиноприл, который является пролекарством и действует после всасывания и трансформации в активный метаболит — фозиноприлат (рис. 1), который циркулирует в связанном с белками плазмы крови (95–98 %) состоянии. Фозиноприл трансформируется в активный метаболит в печени и в слизистой желудочно-кишечного тракта. Широкая распространенность антигипертензивных средств и дороговизна оригинальных препаратов из группы ингибиторов АПФ обуславливает активный поиск возможностей перевода пациентов на более дешевые и экономически выгодные варианты терапии: замена препарата внутри одного класса или между классами, замена оригинального препарата на воспроизведённый и т.д. Известно, что в клинической практике даже те препараты, которые содержат одно и то же действующее активное вещество, но разработанные различными фармкомпаниями, могут существенно отличаться по фармакологической активности. Нередко это обусловлено различием ингредиентов состава вспомогательных веществ, содержащихся в твёрдой лекарственной форме [1]. Во всём мире для подтверждения одинаковой те-

рапевтической активности воспроизводимых препаратов проводятся исследования биоэквивалентности. При этом в качестве основного критерия выбирается достаточно «близкая» биодоступность изучаемых лекарственных средств [4, 5, 9]. В этой связи, целью настоящей работы являлось исследование биоэквивалентности воспроизведённого лекарственного препарата Кардиоприл (Т — АО «Химфарм», Республика Казахстан) в сравнении с инноватором Моноприл (R — Бристол-Майерс Сквибб С.р.Л., Италия).

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты

В качестве тест-препарата (Тест; Т) использовали Кардиоприл, таблетки, содержащие 20 мг фозиноприла (производитель фирма АО «ХИМ-ФАРМ», Республика Казахстан), в качестве препарата-сравнения (Референс; R) использовался препарат Моноприл, таблетки, содержащие 20 мг фозиноприла (фирма «Бристол-Майерс Сквибб С.р.Л.», Италия.).

Дизайн исследования

Дизайн исследования соответствовал утвержденному протоколу исследования (№ ВЕq-Fos-07-2012 от 15.05.2012г.), а также требованиям «Надлежащей клинической практики» (GCP) [2-

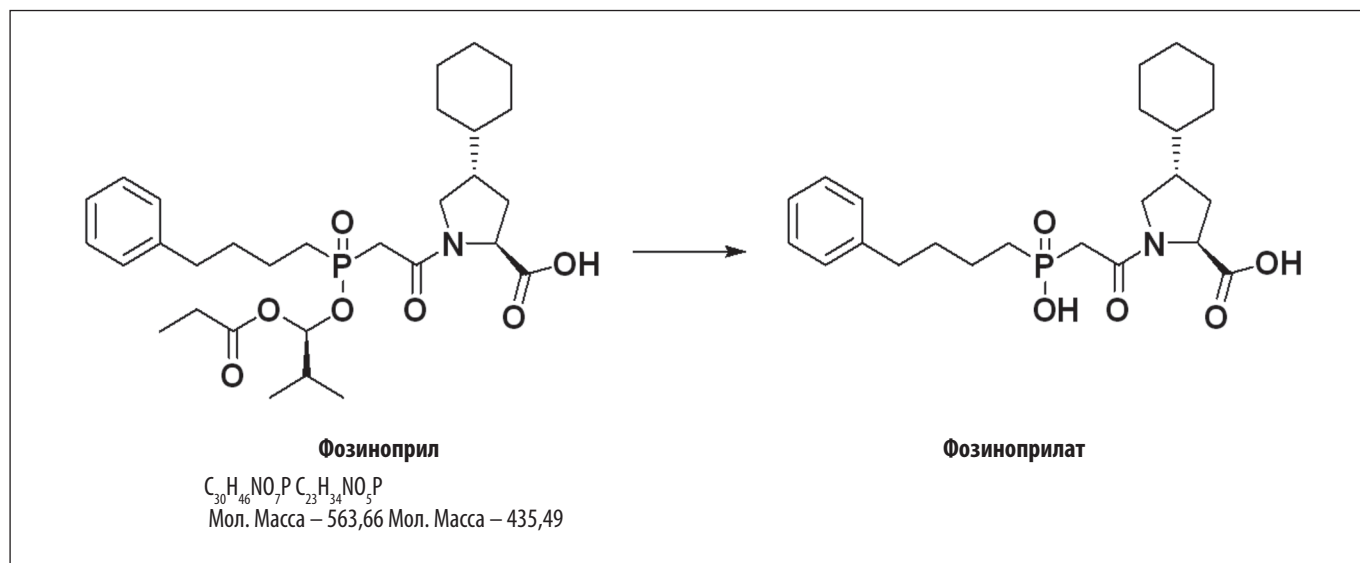


Рис. 1. Структурная химическая формула фозиноприла и активного его метаболита фозиноприлата

5, 9]. 18 здоровых волонтеров молодого возраста мужского ($n=6$) и женского ($n=12$) пола (возраст — $30,8 \pm 5,9$, массы тела — $67,1 \pm 8,5$) после подписания информированного согласия были направлены в клиническую базу РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ РК. Там они были разделены на 2 группы случайным образом, согласно схеме рандомизации. Все участники были проверены на наличие наркотических веществ и алкоголя, кроме того, волонтерам женского пола был проведен тест на беременность. Общий анализ крови, биохимия и ЭКГ были проведены дважды: до начала исследования и в последний визит (в конце второго этапа исследования). В оба периода исследования участники находились в исследовательском центре непрерывно в течение 48 часов. Период «отмывки» (wash-out) между этапами составлял 7 дней (1 этап — 26.06.2012; 2 этап — 03.07.2012). На обоих этапах исследования отбор образцов крови (5 мл) производился: до введения дозы (0 часов), и в течение 48 часов после введения препарата. Взятие образцов крови для последующего определения содержания активного метаболита фозиноприла — фозиноприлата в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 8,0; 12,0; 24,0; 36,0 и 48,0 после приема препаратов. Перед каждым отбором крови больной находился в течение 5 минут в лежачем положении. Кровь была взята из локтевой вены (с нулевого фона до 6 часов, путем катетеризации локтевой вены) и с 12 по 48 ч. одноразовыми шприцами в количестве 5-10 мл в стеклянные пробирки с добавлением гепарина. Образцы крови отстаивались в течение 15 минут в условиях комнатной температуры, затем путём центрифугирования (3000 об/мин в течение 10 минут) получали

плазму крови. Плазма хранилась при температуре -24°C . Приготовление стандартных растворов фозиноприлата осуществлялось в плазме крови.

Аналитический метод

Для количественного определения фозиноприлата применяли метод [10] с модификациями.

Растворители, реактивы и материалы

Все реактивы, использованные в работе, имели характеристики чистоты не ниже х.ч., растворители имели маркировку HPLC-grade.

Приготовление образцов для анализа

К 1 мл плазмы крови добавляли 200 мкл 1 М соляной кислоты и перемешивали на вортекс-миксере. К полученной смеси долили 5 мл диэтилового эфира и дихлорметана в соотношении 3:1 соответственно. Полученную смесь встряхивали на вортекс-миксере в течение 3 минут. После этого пробирки со смесью центрифугировали в течение 5 минут при 3000 g до полного разделения слоев. Надосадочный органический слой осторожно декантировали, переносили в упарительную пробирку и упаривали под вакуумом при температуре 60°C . Сухой остаток растворяли в 200 мкл метанола, и полученный раствор использовали для анализа. Объём образца вводимого в петлю инжектора прибора составлял 10 мкл.

Определение концентрации фозиноприлата проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Анализ проводили на жидкостном хроматографе «Surveyor» производства «Thermo Fisher Scientific» (США), оснащённом насосом «Finnigan Surveyor LC Pump Plus», автосамплером «Finnigan Surveyor AS Plus» с колоночным термостатом и масс-спектрометрическим детектором «LCQ Fleet MS»

(квадрупольная ионная ловушка). Масс-спектрометр работал в режиме регистрации ионов, положительно заряженных электроспреем (ESI), создаваемым напряжением в 5 кВ. Скорость потока газа-небулайзера (азота): 4 л/мин, давление на распылителе — 100 psi. Температура интерфейса капилляра составляла 300°C, температура нагревателя — 180°C. Амплитуда возбуждения на концевых электродах ловушки 0,1 В. Детектирование проводилось в режиме полного сканирования MS/MS — Full Scan m/z , в диапазоне m/z 120–800. Количественное определение проводили по выбранному дочернему иону (m/z 390,1), образующемуся в результате распада молекулярного иона фозиноприлата (m/z 436,2) при нормализованной энергии соударений 70 eV (масс-спектр второго порядка для фозиноприлата представлен на рис. 2а). В качестве демпфирующего газа в ионной ловушке использовался гелий. Данные обрабатывались с помощью Xcalibur 2.1 w/ Foundation 1.0.1.

Разделение осуществляли на хроматографической колонке Luna C18 Phenomenex, 5 мкм, 4,6×250 мм. Температура разделения 25°C. Элюирование осуществляли в изократическом режиме. Подвижная фаза состояла из двух растворов: 10 mM ацетат аммония (раствор А) и ацетонитрил — 10 mM ацетат аммония (90:10) (раствор Б), взятых в соотношении 30%:70% соответственно. Скорость потока подвижной фазы 0,7 мл/мин. Объем

пробы 10 мкл. Время анализа единичного образца составляло $6 \pm 0,5$ минут. На рис. 2б, 2в и 2г представлены хроматограммы экстрактов blankовой (интактной) плазмы крови, плазмы, содержащей фозиноприлат в концентрации 31,2 и 125 нг/мл соответственно.

Количественный анализ

Количественный анализ проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения «Quan Browser» компании «Termo Fisher Scientific». Калибровочную кривую получали в результате анализа проб плазмы с добавками известных количеств стандарта определяемого соединения. Для построения калибровочной кривой и расчета процента извлечения анализируемого соединения из биоматериала готовили рабочий стандартный раствор фозиноприлата в метаноле — 1 мг/мл. Из него далее методом по-

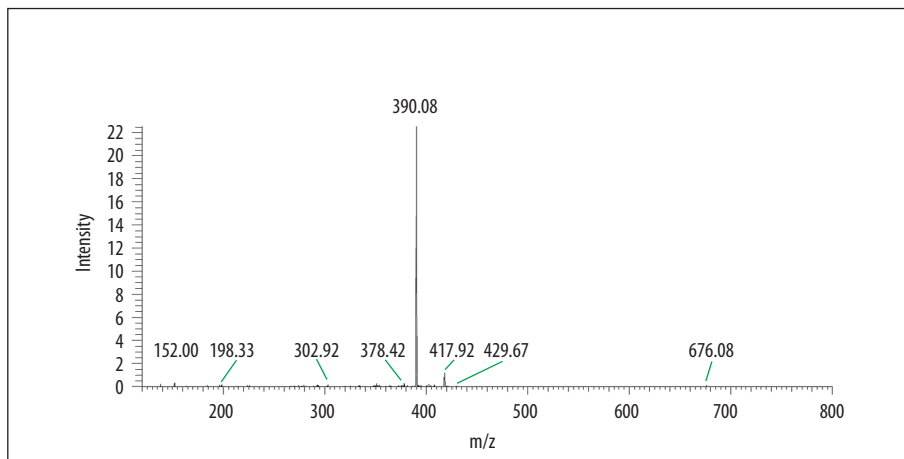


Рис. 2а. Масс-спектр фозиноприлата

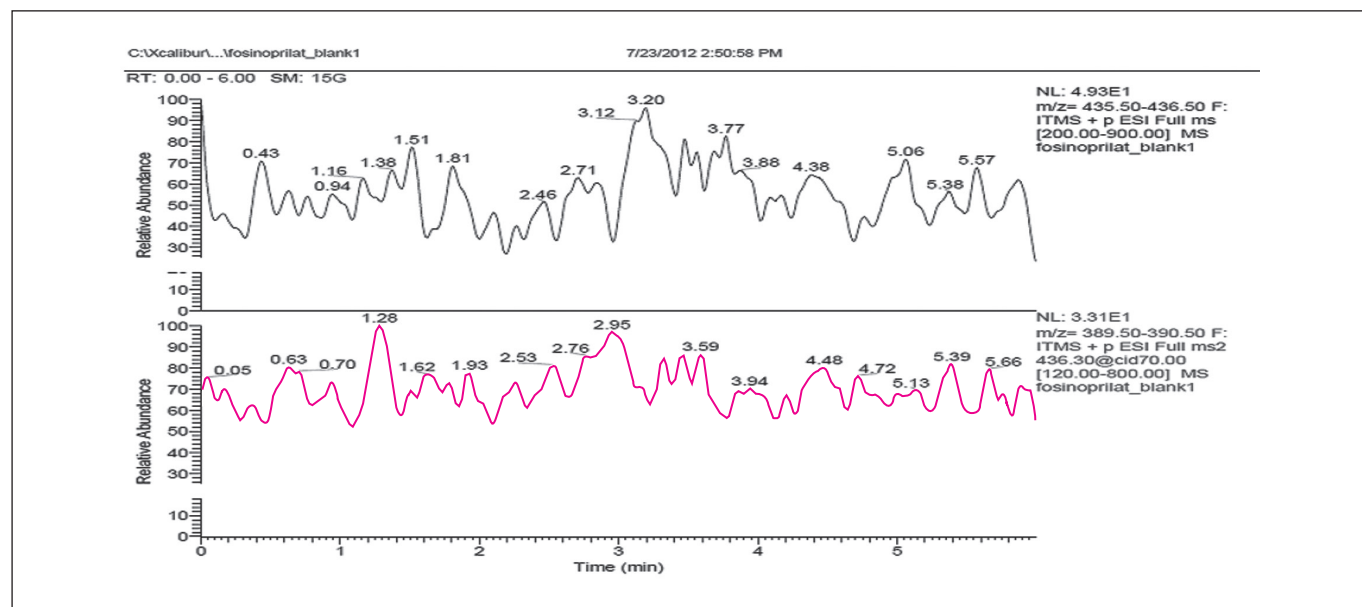


Рис. 2б. Хроматограмма интактной плазмы крови

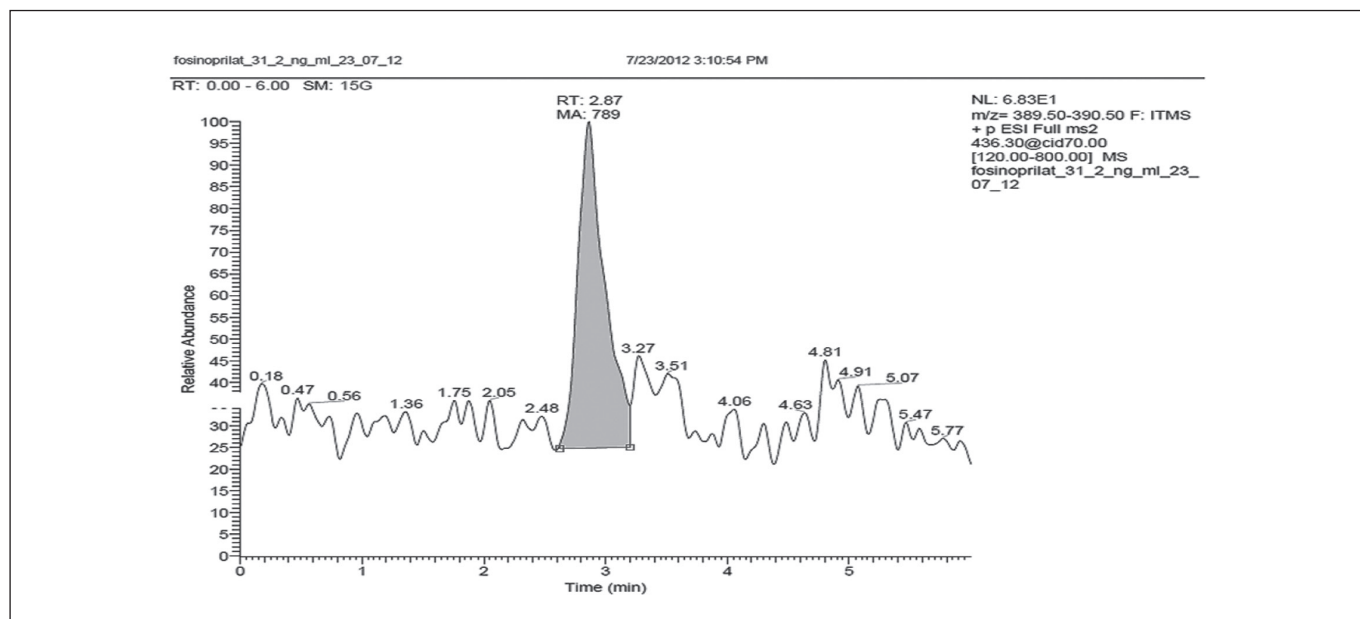


Рис. 2в. Хроматограмма экстракта плазмы крови содержащей 31,2 нг/мл фозиноприлата

Пик с RT 2,87 мин — пик фозиноприлата

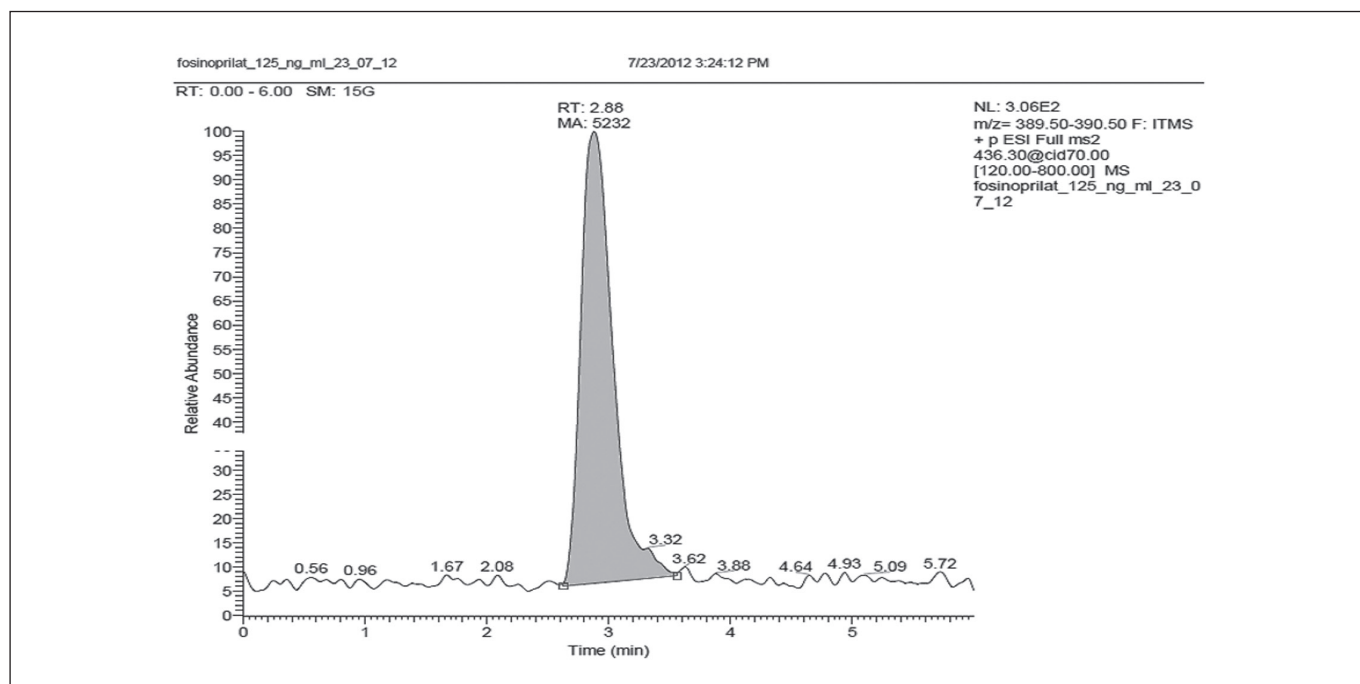


Рис. 2г. Хроматограмма экстракта плазмы крови, содержащей 125 нг/мл фозиноприлата

Пик с RT 2,07 мин — пик фозиноприлата

следовательных разведений готовили серию стандартных растворов фозиноприлата в 50 %-ном водном метаноле с концентрациями: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 и 15,6 нг/мл. Модельные растворы фозиноприлата в плазме крови (для построения внутренней калибровочной кривой) готовили в аналогичных концентрациях. Калибровочная зависимость (рис. 3) была линейной в изучаемом диапазоне концентраций. График описывался ли-

нейным уравнением $Y = 63,4706 \times X$, где Y — площадь пика в условных единицах интегрирования; X — концентрация фозиноприлата, нг/мл. Концентрация фозиноприлата рассчитывалась по формуле: $C_{\text{fosinoprilate}} = 0,015755 \times S$, где $C_{\text{fosinoprilate}}$ — концентрация фозиноприлата (нг/мл), S — площадь пика в условных единицах интегрирования. Коэффициент корреляции составил 0,9974, что соответствует удовлетворительной аппроксимации

[8]. Предел количественного обнаружения в плазме составил 15,6 нг/мл.

Прецизионность и правильность методики оценивали по трем концентрационным уровням рабочих стандартных растворов фозиноприлата после 6 определений каждого уровня. Полученные данные представлены в табл. 1 и 2. Для концентрации 31,25 нг/мл ошибка метода не превышала 15 %.

Точность и воспроизводимость выражалась в виде коэффициента вариации (%C.V.) для каждой серии образцов согласно следующему уравнению:

$$\frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%, \text{ где}$$

SD — стандартное отклонение серии определений;

$\bar{x}$ — среднее арифметическое значение полученных концентраций.

Воспроизводимость измерялась, как процент отклонения (% dev.) от теоретического значения по формуле:

$$\frac{\bar{x} - \bar{\mu}}{\bar{\mu}} \times 100\%, \text{ где}$$

$\bar{x}$ — среднее арифметическое значение полученных концентраций;

$\bar{\mu}$ — теоретическая концентрация.

Метрологическая характеристика среднего результата

$\bar{x}$ — среднее арифметическое значение полученных концентраций;

SD — стандартное отклонение;

$S_{\bar{x}}$ — стандартное отклонение среднего результата;

$\Delta \bar{x}$ — полуширина доверительного интервала ($p=0,95$);

$E\%$ — ошибка среднего результата.

Точность в течение рабочего дня

Каждый из образцов, предназначенных для контроля качества, анализировали в течение 1 рабочего дня (по 6 определений до исследования, во время исследования и после исследования).

Для 31,25 нг/мл средняя точность составила 10,79% C.V. и 0,94% dev. Остальные пробы с концентрациями 125 и 500 нг/мл имели точность от 3,78 до 4,42% C.V. Воспроизводимость колеба-

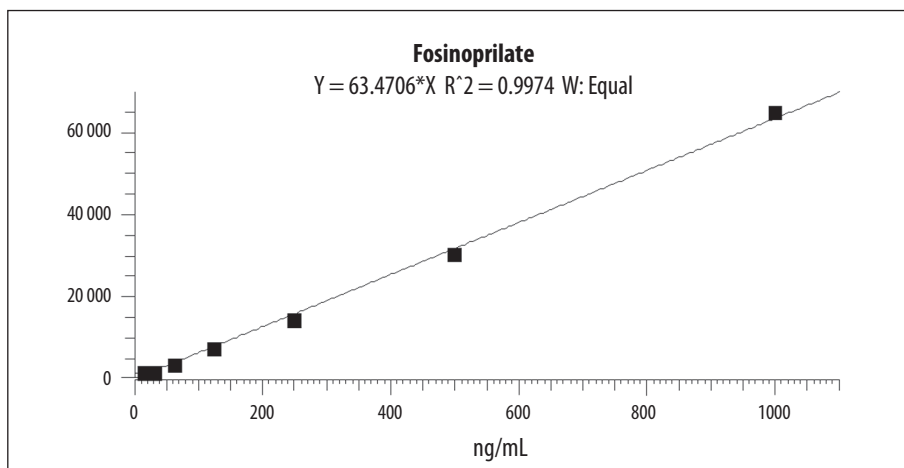


Рис. 3. Калибровочная кривая зависимости концентрации фозиноприлата от площади хроматографических пиков

Таблица 1

Точность количественного определения фозиноприлата в течение рабочего дня

Концентрация нг/мл	%C.V.	%dev	n
31,25	10,79	0,94	6
125,00	3,78	0,77	6
500,00	4,42	4,84	6
Предел количественного определения — 15,6 нг/мл			

лась от 0,77 до 4,84 % dev. Результаты представлены в табл. 1. Метрологические характеристики разработанной методики представлены в табл. 2. Относительная ошибка определения фозиноприлата не превышала 10 %.

Степень извлечения. Расчёт степени извлечения фозиноприлата проводили с использованием площадей пиков водно-метанольных растворов стандарта препарата и площадей пиков, полученных при хроматографировании экстрактов образцов бланковой плазмы крови (плацебо) с добавкой препарата. В 1,0 мл бланковой плазмы вносилась добавка стандартных растворов фозиноприлата с таким расчетом, чтобы конечная концентрация препарата в плазме составляла 31,25, 125 и 500 нг/мл. Эти растворы тщательно перемешивались на вибромиксере типа «Вортекс». Затем к пробам добавлялась 1 М соляная кислота в количестве 200 мкл. К подкисленной плазме крови доливали экстракционную смесь — эфир:дихлорметан (3:1) и встряхивали на вортексе в течение 3 минут. Затем смесь центрифугировали при 3000 г.р.м. для разделения слоев. Верхний органический надосадочный слой осторожно декантировали и переносили в упарительную пробирку. Супернатант упаривали досуха под вакуумом при 60°C, сухой остаток растворяли в 200 мкл 50%-ного водного метанола. 10 мкл полученного раствора вводили в хроматограф. Данную процедуру экстракции

Таблица 2

Метрологические характеристики методики определения фозиноприлата в плазме крови

Взято	Найдено (нг/мл)						$\bar{x}$	SD	Sx	Δx	$\epsilon\%$
31,25	33,62	30,46	33,95	32,97	32,52	32,05	32,59	1,26	0,92	2,36	7,23
125,00	124,81	123,60	127,93	121,39	123,04	121,88	123,78	2,38	1,73	4,44	3,59
500,00	499,7	523,8	493,1	485,8	510,2	496,2	501,5	13,57	10,36	26,61	5,31

фозиноприлата с концентрациями 31,25; 125 и 500 нг/мл в плазме повторили трехкратно для каждой из концентраций. Полученные значения степени извлечения для трех параллельных экспериментов для концентрации фозиноприлата 31,25; 125 и 500 нг/мл в плазме представлены в таблице 3.

Было установлено, что степень экстракции фозиноприлата (среднее из 3-х определений на точку, в %, %) в данных условиях составила: $82,5 \pm 3,6\%$ (см. табл. 3).

Содержание фозиноприлата в анализируемых образцах определяли по формуле:

$$C_x = \frac{C \times V_1}{V_2}, \text{ где}$$

C — концентрация вещества, найденная по калибровочной кривой;

V_1 — объём растворителя сухого остатка;

V_2 — объём плазмы крови взятый для анализа.

Статистическая обработка полученных результатов

Полученные экспериментальные данные подвергнуты математической статистической обработке с помощью программы «Statistica v.6.0». В табл. 2. приведены средние арифметические значения ($\bar{x}$), соответствующие им стандартные отклонения (SD) и стандартные ошибки среднего значения ($S_{\bar{x}}$), коэффициенты вариации (C.V.%). Расчет фармакокинетических параметров анализируемых препаратов был проведен с использованием модельно-независимого метода. В работе кроме ($\bar{x}$) и (SD) приведены коэффициенты вариации (C.V.%) и размах — непараметрический параметр статистики (разность между максимальным и минимальным значениями ряда). Оценка биоэквивалентности проводилась применительно к параметрам AUC_{0-t} , C_{max} (натуральные и логарифмически преобразованные данные) с использованием методов параметрической статистики. В табл. 3 представлены результаты работы анализа вариации ANOVA для различных показателей биоэквивалентности ($\ln AUC_{0-t}$, $\ln C_{max}$). Условием применения является предположение о нормальном распределении изучаемого показателя. Нулевая гипотеза: между средними значениями показателей биоэквивалентности тест- и референс-препарата отсутствуют статистически значимые различия.

В качестве источников вариации изучаются межиндивидуальные различия (испытуемые), последовательность получения препаратов и различия между препаратами. Полученные значения сравниваются со значением остаточной вариации с учетом числа степеней свободы (DF). Результаты сравнения отражены в столбце F табл. 6. Для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» должно превзойти соответствующее табличное значение (таблица критерия Фишера для числа степеней свободы (1, n-2) и выбранного уровня значимости α). В нашем случае, для 18 добровольцев табличное значение F критическое равно 4,49 для 5 % уровня значимости. Если рассчитанное значение F превосходит табличное значение, нулевая гипотеза об отсутствии значимых различий между средними значениями данного показателя биоэквивалентности может быть отброшена, а различия признаны статистически значимыми на соответствующем уровне значимости.

Рассчитывали парные критерии Стьюдента в предположении отсутствии влияния периода получения препарата и нормального распределения изучаемого показателя. Гипотеза биоэквивалентности принималась, когда 90 % доверительный интервал

Таблица 3

Определение степени экстракции фозиноприлата из плазмы крови

Взято (нг/мл)	Найдено (%)			Среднее значение	Стандартная ошибка	Стандартное отклонение
31,2	83,3	85,7	78,6	82,5	2,6	3,6
125,0	78,2	80,1	84,5	80,9	1,9	3,2
500,0	76,9	81,4	78,7	79,0	1,3	2,3
				82,5	2,3	3,6

тервал для отношения среднего значения (mT/mR) логарифмически преобразованных данных AUC составлял $0,8 < \mu_T/\mu_R < 1,20$ и для C_{max} $0,7 < \mu_T/\mu_R < 1,43$. Границы, этих интервалов, рассчитывались при помощи дисперсионного анализа ANOVA. Расчет 90 % доверительных интервалов проводили с использованием программы Bioeqv [6].

Результаты и их обсуждение

На рис. 4 — представлены усредненные фармакокинетические кривые фозиноприлата в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток Кардиоприл и Моноприл, где анализируемое лекарственное вещество определяется на протяжении 48 часов.

Сравнительный анализ основных фармако-

для T — $3,22 \pm 0,55$ и для R — $3,39 \pm 0,61$ час, соответственно. При этом средняя максимальная концентрация фозиноприлата, определяемая в плазме крови добровольцев (C_{max}), составила для препарата Кардиоприл — $357,65 \pm 135,73$ нг/мл и для Моноприл — $364,62 \pm 117,58$ нг/мл.

Индивидуальный анализ основного параметра, характеризующего степень и скорость всасывания действующего вещества из лекарственной формы — $AUC_{0 \rightarrow t}$ указывает на значительную вариабельность данного параметра (размах для препарата Кардиоприл составил 5923,62 и для препарата Моноприл — 6638,93 нг/мл×ч). Среднее значение $AUC_{0 \rightarrow t}$ для тест-препарата составило $4194,74 \pm 1753,74$ и для референс-препарата — $4142,84 \pm 1884,20$ нг/мл×ч. Относительная биодоступность таблеток Кардиоприл по отношению

к таблеткам Моноприл, определяемая отношением соответствующих значений $AUC_{0 \rightarrow t}$, составила в среднем $1,0701 \pm 0,3166$ (усреднённые данные на основании точечных индивидуальных оценок). Доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений $AUC_{0 \rightarrow t}$ составил 0,9393-1,1473. Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений C_{max} , составила $0,9956 \pm 0,2401$, а доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений C_{max} — 0,8861-1,066 (табл. 5). Полученные доверительные интервалы лежат, в установ-

ленных «Рекомендациями», пределах, что говорит в пользу биоэквивалентности исследуемых препаратов [5].

Дисперсионный анализ также показал, что 2 источника вариации, учитываемых при установлении биоэквивалентности, т.е. «препараты» и «испытываемые» в дисперсионных отношениях F

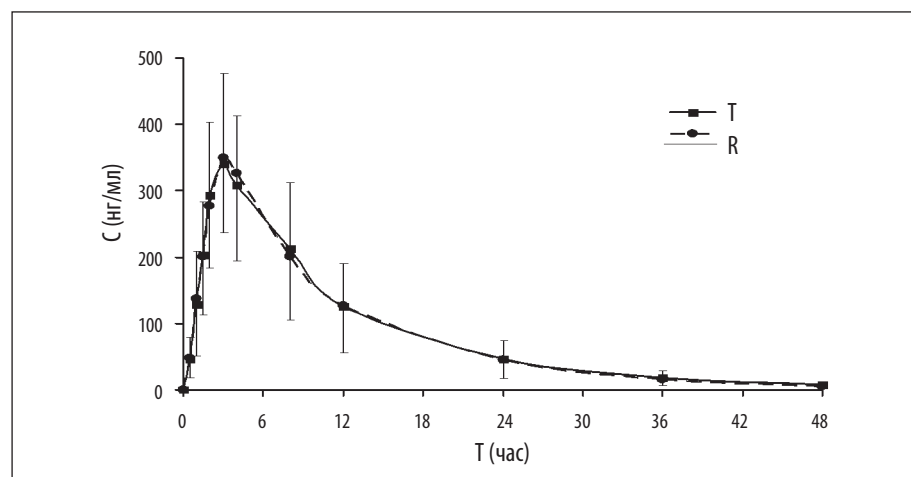


Рис. 4. Усреднённые кинетические кривые фозиноприлата в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток КАРДИОПРИЛ (Т) и таблеток МОНОПРИЛ (Р): (n=18; $\pm SD$)

кинетических параметров (табл. 4) фозиноприлата после однократного приёма 20 мг таблеток Кардиоприл и Моноприл показал, что изучаемые препараты почти с одинаковой скоростью всасываются из желудочно-кишечного тракта (параметр $C_{max}/AUC_{0 \rightarrow t}$ — для Т составил $0,089 \pm 0,016$; для Р — $0,095 \pm 0,020$ ч⁻¹; $\bar{x} \pm SD$). Время достижения максимальной концентрации (t_{max}) составило в среднем

Фармакокинетические параметры фозиноприлата у добровольцев после однократного приёма 20 мг Кардиоприла (Т) и Моноприла (Р)

Таблица 4

Параметры	$AUC_{0 \rightarrow t}$ (нг/мл·ч)		C_{max} (нг/мл)		t_{max} (ч)		C_{max}/AUC (ч ⁻¹)	
	Т	Р	Т	Р	Т	Р	Т	Р
$\bar{x}$	4194,74	4142,84	357,65	364,62	3,22	3,39	0,089	0,095
SD	1753,74	1884,20	135,73	117,58	0,55	0,61	0,016	0,020
$s\bar{x}$	413,62	444,39	32,01	27,73	0,13	0,14	0,004	0,005
C.V.%	41,8	45,5	37,9	32,2	17,0	17,9	18,5	20,5
Размах	5923,62	6638,93	562,50	475,50	2,000	2,000	0,05834	0,07291

Таблица 5

90 % доверительные интервалы отношения средних значений (μ_T/μ_R) AUC_{0-t} , C_{max} (логарифмически преобразованные данные), полученные на основе дисперсионного анализа (ANOVA)

Параметры	Нижнее значение	Среднее значение	Верхнее значение
AUC_{0-t}	0,93927	1,0701	1,14729
C_{max}	0,88613	0,9956	1,06612

для этих факторов не превосходят табличное значение (табл. 6).

Таблица 6

Результаты дисперсионного анализа фармакокинетических параметров ($\ln AUC_{0-t}$ и $\ln C_{max}$), определяющих биодоступность фозиноприлата из таблеток

$\ln AUC_{0-t}$				
Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,013	1	0,013	0,42558
Последовательность	0,004	1	0,004	0,13268
Испытуемые	7,997	17	0,470	15,92580
Остаточная вариация	0,473	16	0,030	—
Общая вариация	8,486	35	—	—

$\ln C_{max}$				
Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,007	1	0,007	0,28832
Последовательность	0,004	1	0,004	0,15250
Испытуемые	4,511	17	0,265	10,51495
Остаточная вариация	0,404	16	0,025	—
Общая вариация	4,926	35	—	—

Обозначения в таблице:

SS — сумма квадратов отклонений;

MS — средний квадрат;

DF — число степеней свободы;

F — рассчитанное значение F-критерия Фишера (при уровне значимости $\alpha=5\%$)

Следует подчеркнуть, что для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» должно превзойти соответствующее табличное значение (таблица критерия Фишера для числа степеней свободы (1, n-2) и выбранного уровня значимости α). В нашем случае, для 18 пациентов табличное значение F критическое равно 4,49 для $P=0,95$. Рассчитанное значение F не превосходит табличное значение (для параметра $\ln AUC_{0-t}$ $F = 0,42558$ и для $\ln C_{max}$ $F = 0,28832$). Следовательно, нулевая гипотеза об отсутствии значимых различий между средними значениями данного показателя биоэквивалентности подтверждается, а различия не признаются статистически значимыми на соответствующем уровне значимости. Из результатов исследования относительной биологической доступности двух препаратов следует, что исследуемый препарат Кардиоприл, таблетки 20 мг, производства АО «Химфарм», Республика Казахстан является биоэквивалентным препарату сравнения Моноприл, таблетки 20 мг, производства «Бристол-Майерс Сквибб С.р.Л.», Италия.

Выводы

1. Таблетки Кардиоприл с фармакокинетической позиции являются биоэквивалентным к таблеткам Моноприл.
2. Результаты сравнительного фармакокинетического исследования позволяют утверждать, что Кардиоприл и Моноприл имеют одинаковую эффективность и переносимость.
3. С учётом основных положений доказательной медицины и фармации целесообразность проведения генерической замены препарата Моноприл препаратом Кардиоприл является обоснованной.

Литература

1. Кутишенко Н.П., Марцевич С.Ю., Кобалава Ж.Д., Шаварова Е.К. Значение показателей терапевтической эквивалентности при замене оригинального препарата на воспроизведённый на примере фозиноприла. Ж. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2011. Т. 7, №4, С. 431-436.
2. Надлежащая клиническая практика, основные положения, СТ РК 1616-2006, Астана, 2006, с. 68.
3. Национальный стандарт Российской Федерации. Надлежащая клиническая практика, ГОСТ Р.52379-2005, Москва, 2005, с. 26.
4. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств. Москва, 2008; 32.
5. Проведение надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в республике Казахстан, Астана, 2007, с. 44.
6. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. Москва, Издательство РАМН, 2003; с. 208.
7. Соколов А.В., Белоусов Ю.Б., Зырянов С.К., Нечаева Е.Б., Милкина С.Е. Пути обеспечения качества и безопасности генерических лекарственных препаратов. Фармакокинетика и фармакодинамика, 2012. № 1, С. 43-49.
8. Сычев К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. 2010, с. 216.
9. Handbook For Good Clinical Research Practice (GCP): guidance for implementation, Printed in France. 2005, p.132
10. Jemal M., Mulvana D.E. Liquid chromatographic—electrospray tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantitation of the prodrug fosinopril and the active drug fosinoprilat in human serum. J. Chromatogr. B. 2000. Vol. 739. P. 255—271.

Открытое, рандомизированное, перекрёстное исследование сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов Сантодарон и Кордарон

Абаимов Д. А.¹, Сариев А. К.¹, Ширяева М. В.¹, Прохоров Д. И.¹, Алтынбеков С. А.², Джолдыгулов Г. А.², Серяков В. Н.², Будац Я. М.³, Курилов О.³

¹ — ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН, Москва, Россия

² — РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ РК, Казахстан

³ — АО «Химфарм», Казахстан

Резюме

В рамках перекрёстного, однократного, открытого, рандомизированного исследования с однонедельным периодом отмывки, с двумя последовательностями была изучена биоэквивалентность двух таблетированных форм амиодарона на 18 добровольцах (дозировка 200 мг). Образцы плазмы крови анализировали валидированным методом ВЭЖХ–МС/МС в течение 96 часов. Для анализируемых препаратов рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: AUC_{0-t} , C_{max} , t_{max} , C_{max}/AUC . Степень биологической доступности для AUC_{0-t} составила $0,976 \pm 0,252$ и для C_{max} — $1,113 \pm 0,565$. По результатам исследования был сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов амиодарона.

Ключевые слова: Сантодарон, Кордарон, амиодарон, фармакокинетика, биоэквивалентность

Введение

Амиодарон, синтезированный в 1960 году в Бельгии, первоначально использовался, как средство для лечения стенокардии. Но через некоторое время было выявлено, что этот препарат обладает антиаритмическим потенциалом. В этом качестве амиодарон (Кордарон, фармацевтическая компания «Санофи авентис») быстро распространился по всему миру, получив заслуженное признание, как высокоэффективное средство профилактики и лечения аритмий.

Во многом широкому использованию амиодарона способствовали его уникальные свойства, выделяющие его среди всех антиаритмических средств. Это естественным образом нашло своё отражение в частоте применения препарата. На сегодняшний день при необходимости назначения антиаритмической терапии свой выбор в пользу амиодарона делают 24,1% врачей в США, 34,5% — в Европе и 73,8% — в Латинской Америке. По своей химической структуре амиодарон является йодированным производным бензофурана. Каждая доза амиодарона 200 мг содержит 75 мг йода. Несмотря на длительный опыт применения, фармакокинетика амиодарона остаётся не до конца понятной. Отчасти сложный фармакокинетический профиль амиодарона может быть объяснён его

крайне высокой липофильностью и большим объёмом распределения. Биодоступность амиодарона после перорального приёма составляет 30–80%. Поскольку препарат обладает высокой жирорастворимостью, в особенно высоких концентрациях он обнаруживается в жировой ткани и органах с хорошим кровоснабжением (концентрация в жировой ткани, печени, почках, миокарде выше, чем в плазме соответственно в 300, 200, 50 и 34 раза). Период полувыведения амиодарона отличается большой вариабельностью и зависит от способа его измерения. Относительно быстрое снижение концентрации амиодарона в плазме крови после внутривенного введения не отражает истинного периода полувыведения, так как препарат переходит в ткани. Таким образом, выведение амиодарона после перорального приёма осуществляется в 2 фазы: начальный период — 4–21 ч, во второй фазе $T_{1/2}$ — 25–110 дней. Особенности фармакокинетики амиодарона обуславливают необходимость применения препарата в высоких нагрузочных дозах. В организме человека амиодарон участвует ферментов печени превращается в активный метаболит дезэтиламиодарон, концентрация которого превышает концентрацию исходного вещества в течение длительной терапии. Альтернативным путём метаболизма амиодарона является дейодирование. Известно, что амиодарон является ингибитором

ряда изоферментов печени, таких как CYP2C9, CYP2D6 и CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7. Существуют выраженные индивидуальные различия в плазменной концентрации как амиодарона, так и дезэтиламиодарона, определяющие антиаритмическую эффективность препарата [1]. В связи с указанными фармакологическими особенностями амиодарона именно метод исследования биоэквивалентности представляется оптимальным подходом для определения степени подобия дженерика оригинальному лекарственному препарату.

Таким образом, целью данной работы стало изучение сравнительной биодоступности двух препаратов амиодарона: лекарственного препарата Сантодарон (АО «Химфарм», республика Казахстан) и Кордарон® (Санофи Винтроп Индустрия, Франция). Оценка биоэквивалентности амиодарона проводилась согласно утверждённому протоколу исследования, посредством изучения его содержания в плазме крови испытуемых.

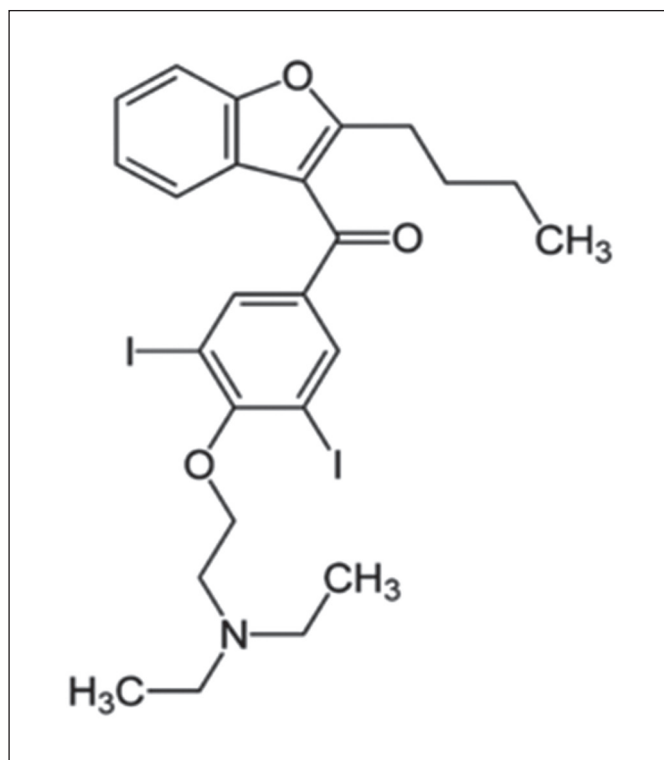


Рис. 1. Химическая структура амиодарона

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты

Тест-препарат (Т): САНТОДАРОН таблетки 200 мг производства АО «Химфарм», Республика Казахстан. Серия 10212. Срок годности до 03.2015 года.

Препарат сравнения (R): КОРДАРОН таблетки 200 мг «Санофи Винтроп Индустрия», Франция. Серия № 1v054, срок годности до 03.2015.

Дизайн исследования

Дизайн исследования соответствовал утверждённому протоколу исследования (идентификационный код протокола № BEq-Am-08–2012 от 01.06.2012 г.), а также требованиям «Надлежащей клинической практики» (GCP) [2–5, 8]. 18 здоровых волонтеров молодого возраста мужского (n=4) и женского (n=16) пола (возраст — $30,9 \pm 8,4$, масса тела — $63,9 \pm 9,6$) после подписания информированного согласия были направлены в клиническую базу РГКП «Республиканский научно-практический центр психиатрии, психотерапии и наркологии» МЗ РК. Там они были разделены на 2 группы случайным образом, согласно схеме рандомизации. Все участники были проверены на наличие наркотических веществ и алкоголя, кроме того, волонтерам женского пола был проведён тест на беременность. Общий анализ крови, биохимия и ЭКГ были проведены дважды: до начала исследования и в последний визит (в конце второго этапа исследования). В оба периода исследования участники находились в исследовательском центре непрерывно в течение 96 часов. Отмывочный период между 1 и 2 этапами исследования составлял 1 месяц. На обоих этапах исследования отбор образцов крови (5 мл) производился: до введения дозы (0 часов), и в течение 96 часов после введения препарата. Взятие образцов крови для последующего определения содержания амиодарона в плазме крови осуществлялось в дискретные интервалы времени 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 12,0; 24,0; 48,0 и 96,0 после приёма препаратов. Перед каждым отбором крови больной находился в течение 5 минут в лежачем положении. Кровь была взята из локтевой вены (с нулевого фона до 6 часов, путём катетеризации локтевой вены) и с 8 по 96 ч. одноразовыми шприцами в количестве 5–10 мл в стеклянные пробирки с добавлением гепарина. Образцы крови отстаивались в течение 15 минут в условиях комнатной температуры, затем путём центрифугирования (3000 об/мин в течение 10 минут) получали плазму крови. Плазма хранилась при температуре -24°C . Приготовление стандартных растворов амиодарона осуществлялось в плазме крови.

Аналитический метод

Оценка биоэквивалентности Сантодарона проводилась согласно утверждённому протоколу исследования, посредством изучения содержания амиодарона в плазме крови испытуемых по методу Kollroser с модификациями [9]. Образцы плазмы крови были доставлены авиатранспортом в замороженном виде в специальных транспортировочных контейнерах, заполненных хладагентом вместе с сопроводительной документацией.

Растворители, реактивы и материалы

Ацетонитрил (HPLC grade; Labscan, Польша); Ацетат аммония о.с.ч. (ООО «Химмед», Россия); Амиодарона гидрохлорида субстанция (Cambrex Profarmaco, Италия, сер. 762326, срок годности 11.2015 г.); Вода деионизованная, полученная с использованием установки обратного осмоса «Simplicity UV» (Millipore, Франция); Эфир диэтиловый ч.д.а (ОАО «Медхимпром», Россия); Спирт метиловый (HPLC grade; Labscan, Польша); Натрий лимоннокислый 3-х замещенный, 5,5-водный х.ч. (ООО «Диаэм», Россия); Лимонная кислота, х.ч. (ООО «Химмед», Россия).

Приготовление рабочих стандартных растворов

В качестве стандартного раствора использовали рабочий стандартный раствор амиодарона с концентрацией 1 мг/мл в метаноле. Из данного раствора методом последовательных разведений готовили рабочие стандартные растворы амиодарона с концентрациями 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 и 15,6 нг/мл в 50%-ном водном метаноле. Все приготовленные растворы хранили при 4°C. Приготовленные стандартные растворы амиодарона были стабильны в течение всего периода исследования, начиная с момента разработки методики и до последнего дня анализа биологических образцов.

Приготовление модельных растворов в плазме крови

Модельные растворы в плазме крови готовили из рабочих стандартных растворов с концентрациями 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 и 0,156 мкг/мл методом внесения 100 мкл аликвоты последних в 900 мкл интактной плазмы крови с таким расчётом, чтобы конечная концентрация амиодарона в плазме составляла 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 и 15,6 нг/мл.

Приготовление образцов для анализа

Для выделения амиодарона из плазмы крови и очистки экстракта использовали метод жидкостной экстракции [10]. К 0,5 мл плазмы крови добавляли 1 мл 0,5 М цитратного буфера (рН 6,2) и перемешивали на вортекс-миксере. К полученной смеси долили 6 мл диэтилового эфира. Полученную смесь встряхивали на вортекс-миксере в течение 10 минут. После этого пробирки со смесью центрифугировали в течение 5 минут при 3000 g до полного разделения слоев. Надосадочный органический слой осторожно декантировали, переносили в упарительную пробирку и упаривали под вакуумом при температуре 45 °С. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл метанола. Полученный раствор вводили в петлю прибора в объёме 10 мкл. Определение концентрации амиодарона проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Анализ проводили на жидкостном хроматографе «Surveyor» производства «Thermo Fisher Scientific» (США), оснащённом насосом «Finnigan Surveyor LC Pump Plus», автосамплером «Finnigan Surveyor AS Plus» с колоночным термостатом и масс-спектрометрическим детектором «LCQ Fleet MS» (квадрупольная ионная ловушка). Масс-спектрометр работал в режиме регистрации ионов, положительно заряженных электроспреем (ESI), создаваемым напряжением в 5 кВ. Скорость потока газа-небулайзера (азота): 4 л/мин, давление на распылителе — 100 psi. Температура интерфейса капилляра составляла 300°C, температура нагревателя — 180°C. Амплитуда возбуждения на концевых электродах ловушки 0,1 В. Детектирование проводилось в режиме полного сканирования MS/MS — Full Scan ms^2 , в диапазоне m/z 200–1000. Количественное определение проводили по выбранным дочерним ионам с m/z 276,0; 319,0; 446,0; 573,2 и 646,08 образующемуся в результате распада молекулярного иона амиодарона (m/z 646,1) при нормализованной энергии соударений 25 eV (масс-спектр второго порядка для амиодарона представлен на рис. 2а). В качестве демпфирующего газа в ионной ловушке использовался гелий. Данные обрабатывались с помощью Xcalibur 2.1 w/Foundation 1.0.1. Разделение осуществляли на хроматографической колонке Hypersil GOLD (Thermo Scientific), 1,9 мкм, 4,6×50 мм. Температура разделения 30°C. Элюирование осуществляли в изократическом режиме. Подвижная фаза состояла из двух растворов: 10 mM ацетат аммония (раствор А) и ацетонитрил — 10 mM ацетат аммония (90:10) (раствор Б), взятых в соотношении 10%:90% соответственно. Скорость потока подвижной фазы 0,7 мл/мин. Объём пробы 10 мкл. Время анализа единичного образца составляло 8±0,5 минут. На рис. 2б, 2в и 2г представлены хроматограммы экстрактов blankовой (интактной) плазмы крови, плазмы, содержащей амиодарон в концентрациях 31,2 и 125 нг/мл соответственно. Также рассчитали стандартное и относительное стандартное отклонение хроматографических параметров определения амиодарона: времени удерживания пика и эффективности хроматографической системы.

Количественный анализ

Количественный анализ проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения «Quan Browser» компании «Thermo Fisher Scientific». Калибровочную кривую получали в результате анализа проб плазмы с добавками известных количеств стандарта определяемого соединения.

Для построения калибровочной кривой и расчёта процента извлечения анализируемого соеди-

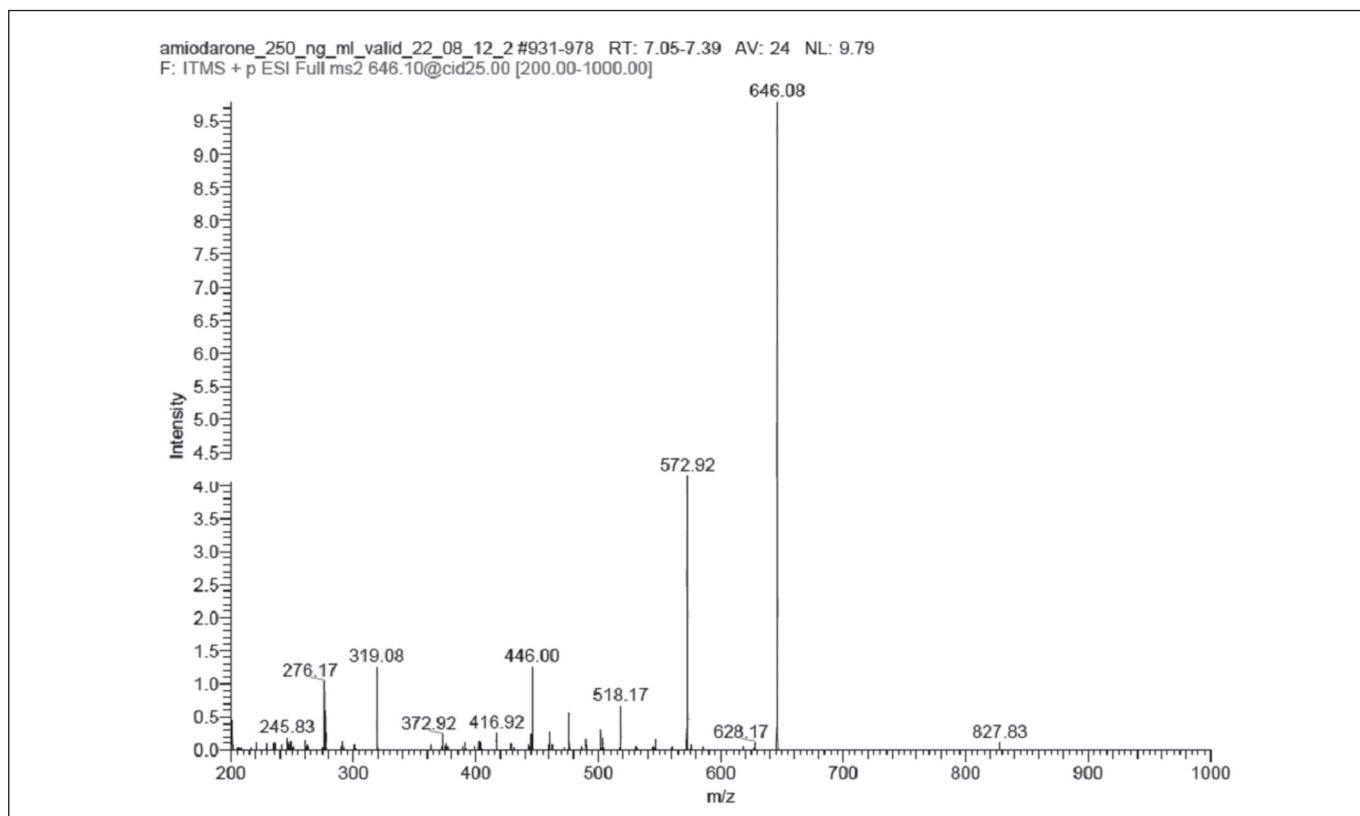


Рис. 2а. Масс-спектр второго порядка для амиодарона

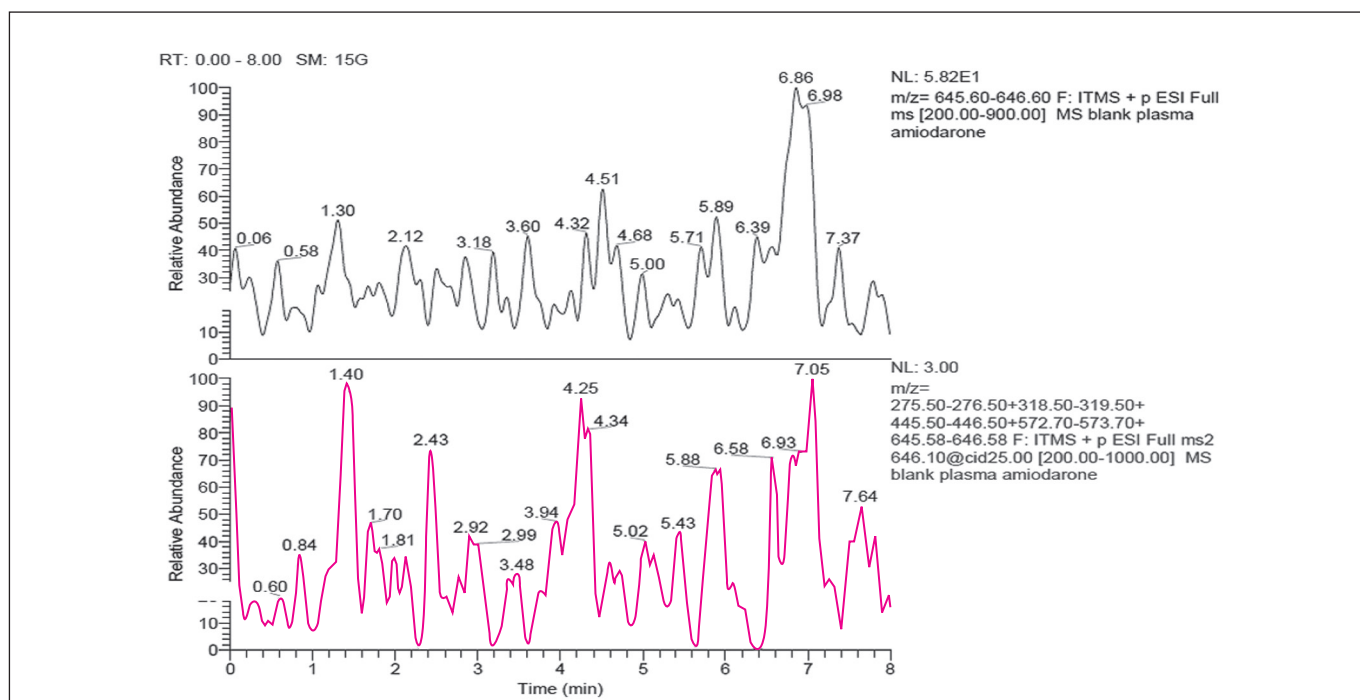


Рис. 2б. Хромотограмма интактной плазмы крови

нения из биоматериала готовили рабочий стандартный раствор амиодарона в метаноле — 1 мг/мл. Из него далее методом последовательных разведений готовили серию стандартных растворов амиодарона в 50%-ном водном метаноле с concentra-

циями: 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 и 15,6 нг/мл. Модельные растворы амиодарона в плазме крови (для построения внутренней калибровочной кривой) готовили в аналогичных концентрациях.

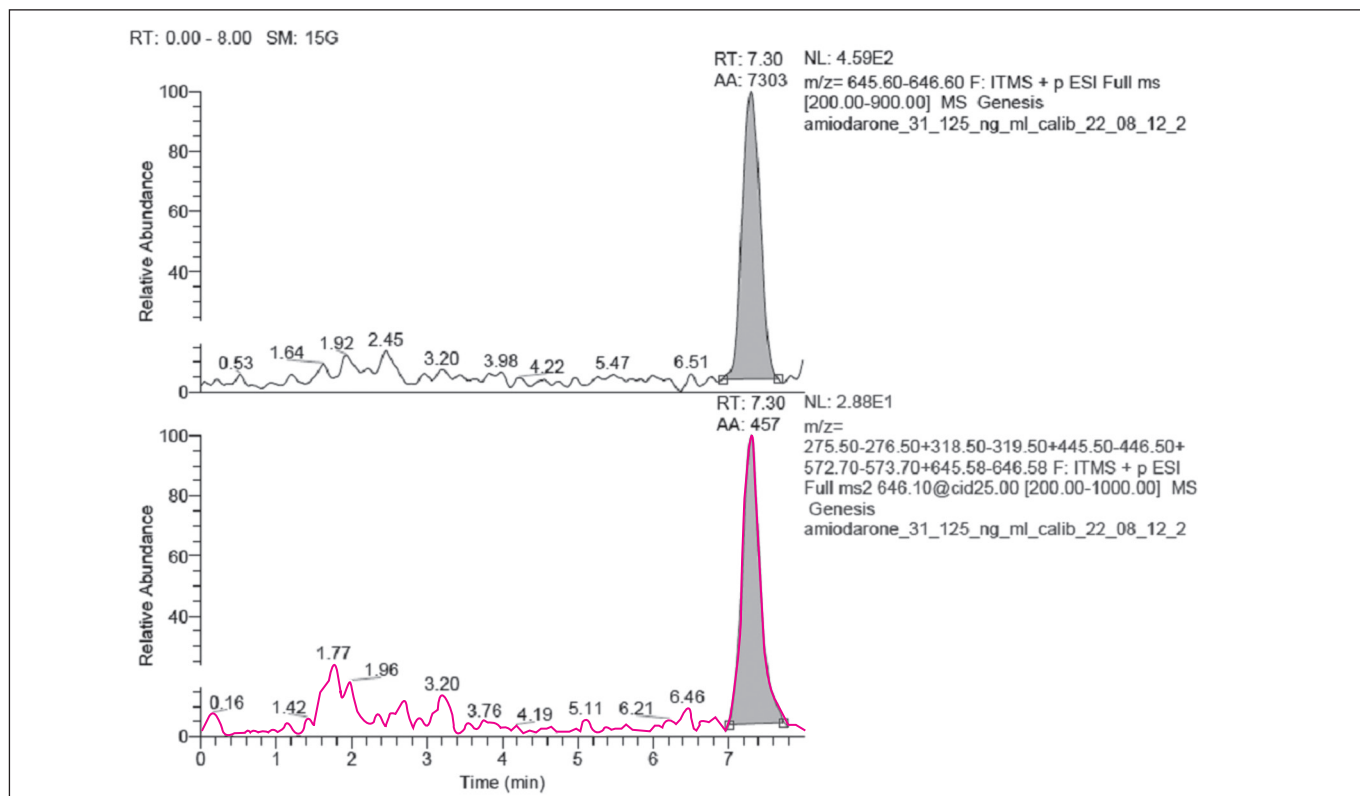


Рис. 2в. Хроматограмма экстракта плазмы крови содержащей 31,2 нг/мл амиодарона
Пик с RT 7,3 мин — пик амиодарона

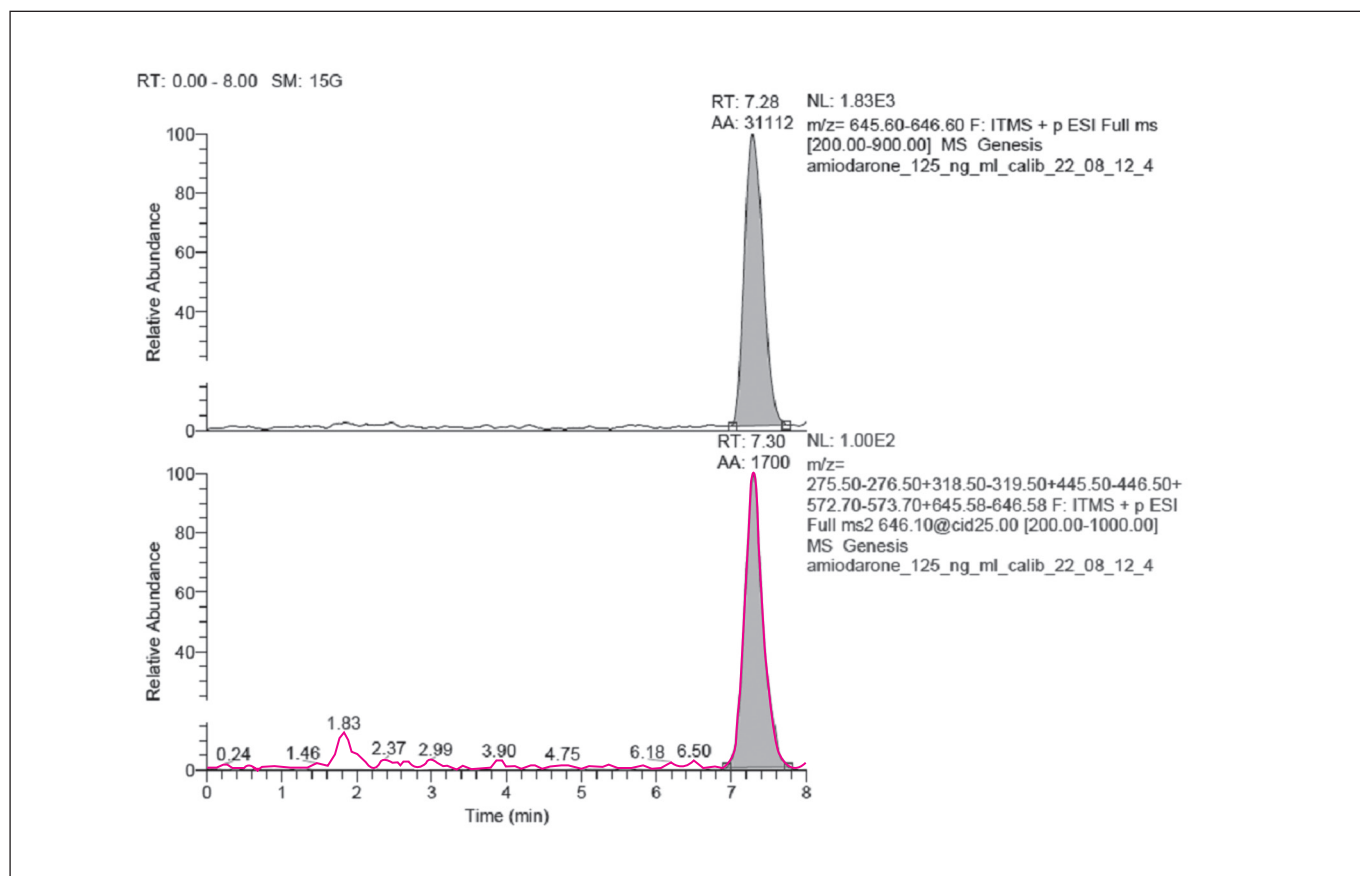


Рис. 2 г. Хроматограмма экстракта плазмы крови, содержащей 125 нг/мл амиодарона
Пик с RT 7,3 мин — пик амиодарона

Калибровочная зависимость (рис. 3) была линейной в изучаемом диапазоне концентраций. График описывался линейным уравнением:

$$Y = 8,75161 \times X, \text{ где}$$

Y — площадь пика в условных единицах интегрирования

X — концентрация амиодарона, нг/мл

Концентрация амиодарона рассчитывалась по формуле:

$$C_{\text{amiodarone}} = 0.11426 \times S, \text{ где}$$

$C_{\text{amiodarone}}$ — концентрация амиодарона (нг/мл)

S — площадь пика в условных единицах интегрирования

Коэффициент корреляции составил 0,9983, что соответствует хорошей аппроксимации [6]. Предел количественного обнаружения в плазме составил 15,6 нг/мл.

Прецизионность и правильность методики оценивали по трём концентрационным уровням рабочих стандартных растворов амиодарона после 6 определений каждого уровня. Полученные данные представлены в табл. 1, 2 и 3. Для концентрации 62,5 нг/мл ошибка метода не превышала 15%.

Точность и воспроизводимость

Точность выражалась в виде коэффициента вариации (%C.V.) для каждой серии образцов согласно уравнению:

$$\frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%, \text{ где}$$

SD — стандартное отклонение серии определений

$\bar{x}$ — среднее арифметическое значение полученных концентраций

Воспроизводимость измерялась, как процент отклонения (% dev.) от теоретического значения по формуле:

$$\frac{\bar{x} - \bar{\mu}}{\bar{\mu}} \times 100\%, \text{ где}$$

$\bar{x}$ — среднее арифметическое значение полученных концентраций

$\bar{\mu}$ — теоретическая концентрация

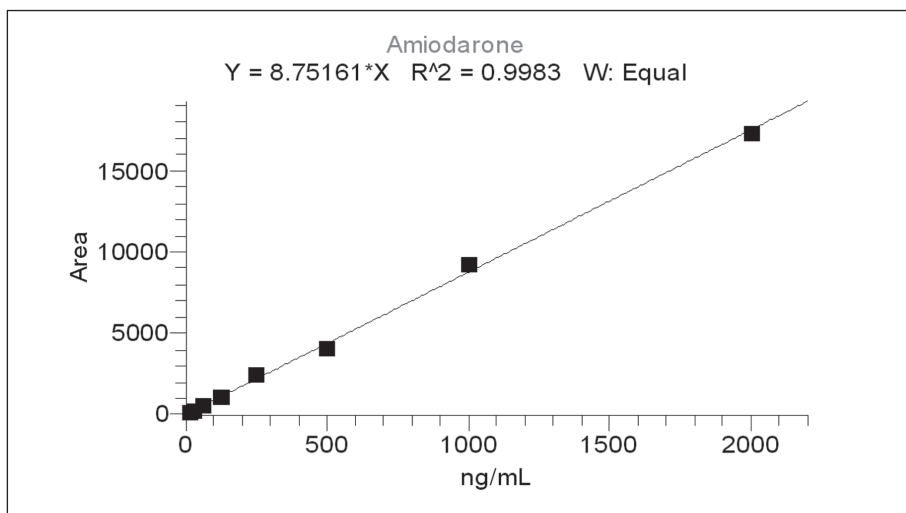


Рис. 2. Калибровочная кривая зависимости концентрации амиодарона от площади хроматографических пиков

Метрологическая характеристика среднего результата

$\bar{x}$ — среднее арифметическое значение полученных концентраций

SD — стандартное отклонение

$S_{\bar{x}}$ — стандартное отклонение среднего результата

$\Delta \bar{x}$ — полуширина доверительного интервала ($P=0,95$)

$\varepsilon\%$ — ошибка среднего результата

Точность в течение рабочего дня

Каждый из образцов, предназначенных для контроля качества, анализировали в течение 1 рабочего дня (по 6 определений до исследования, во время исследования и после исследования).

Таблица 1

Точность количественного определения амиодарона в течение рабочего дня

Концентрация нг/мл	%C.V.	%dev	n
62,5	5.20	—1.87	6
250	7.42	2.71	6
1000	4.3	—0.5	6
Предел количественного определения — 15,6 нг/мл			

Для 62,5 нг/мл средняя точность составила 5,20% C.V. и —1,87% dev. Остальные пробы с концентрациями 250 и 1000 нг/мл имели точность от 4,3 до 7,42% C.V. Воспроизводимость колебалась от —0,5 до 2,71% dev. Результаты представлены в табл. 2.

Метрологические характеристики разработанной методики представлены в табл. 3. Относительная ошибка определения амиодарона не превышала 10%.

Таблица 2

Точность определения амиодарона в плазме крови
в течение рабочего дня

Концентрация добавленная (нг/мл)	62.5	250	1000
Концентрация найденная (нг/мл)	63.57	266.92	935.1
	61.14	265.99	986.9
	61.57	245.36	1032.6
	54.48	219.46	915.7
	60.03	244.59	984.2
	58.72	234.80	988.3
$\bar{x}$	59.91	246.19	973.8
SD	3.12	18.27	42.0
%CV	5.20	7.42	4.3
%dev	-1.87	2.71	-0.5

Степень извлечения. Расчёт степени извлечения амиодарона проводили с использованием площадей пиков водно-метанольных растворов стандарта препарата и площадей пиков, полученных при хроматографировании экстрактов образцов бланковой плазмы крови (плацебо) с добавкой препарата. В 0,5 мл бланковой плазмы вносилась добавка стандартных растворов амиодарона с таким расчётом, чтобы конечная концентрация препарата в плазме составляла 62;5, 250 и 1000 нг/мл. Эти растворы тщательно перемешивались на вибромиксере типа «Вортекс». Затем к пробам добавлялась 0,5 М цитратный буфер в количестве 1 мл. К подкисленной плазме крови доливали диэтиловый эфир в объёме 6 мл и встряхивали на вортексе в течение 10 минут. Затем смесь центрифугировали при 3000 г.р.м. для разделения слоёв. Верхний органический надосадочный слой осторожно декантировали и переносили в упарительную пробирку. Супернатант упаривали досуха под вакуумом при 450С, сухой остаток растворяли в 0,5 мл метанола. 10

мкл полученного раствора вводили в хроматограф. Данную процедуру экстракции амиодарона с концентрациями 62;5, 250 и 1000 нг/мл в плазме повторили трёхкратно для каждой из концентраций. Полученные значения степени извлечения для трёх параллельных экспериментов для концентрации амиодарона 62;5, 250 и 1000 нг/мл в плазме представлены в табл. 4.

Было установлено, что степень экстракции амиодарона (среднее из 3-х определений на точку, в%,%) в данных условиях составила: $82,2 \pm 3,1\%$ (см. табл. 4).

Содержание амиодарона в анализируемых образцах определяли по формуле:

$$C_x = \frac{C \times V_1}{V_2}, \text{ где}$$

C — концентрация вещества, найденная по калибровочной кривой

V_1 — объём растворителя сухого остатка

V_2 — объём плазмы крови взятый для анализа

Статистическая обработка полученных результатов

Полученные экспериментальные данные подвергнуты математической статистической обработке с помощью программы «Statistica v.6.0». В табл. 5. приведены средние арифметические значения ($\bar{x}$), соответствующие им стандартные отклонения (SD) и стандартные ошибки среднего значения ($S_{\bar{x}}$), коэффициенты вариации (C.V.%). Расчёт фармакокинетических параметров анализируемых препаратов был проведён с использованием модельно-независимого метода. Оценка биоэквивалентности проводилась применительно к параметрам AUC_{0-t} , C_{max} (натуральные и логарифмически преобразованные данные) с использова-

Метрологические характеристики методики определения амиодарона в плазме крови

Взято	Найдено (нг/мл)						$\bar{x}$	SD	$S_{\bar{x}}$	Δx	$\epsilon\%$
62.5	59.99	65.18	62.54	63.57	61.14	61.57	62.33	1.85	1.43	3.68	5.91
250	241.0	241.8	236.3	266.9	266.0	245.4	249.6	13.4	11.3	28.9	9.8
1000	979.7	950.6	964.3	935.1	986.9	1032.6	974.9	34.0	24.9	64.0	6.6

Таблица 3

Определение степени экстракции амиодарона из плазмы крови

Взято (нг/мл)	Найдено (%)			Среднее значение	Стандартная ошибка	Стандартное отклонение
62,5	82,1	86,4	78,3	82,3	2,8	4,1
250	79,2	81,1	83,9	81,4	1,7	2,4
1000	85,9	83,4	79,9	83,1	2,1	3,0
				82,2	2,2	3,1

Таблица 4

нием методов параметрической статистики. В табл. 7 представлены результаты работы анализа вариации ANOVA для различных показателей биоэквивалентности ($\ln AUC_{0-t}$, $\ln C_{max}$). Условием применения является предположение о нормальном распределении изучаемого показателя. Нулевая гипотеза: между средними значениями показателей биоэквивалентности тест- и референс-препарата отсутствуют статистически значимые различия. В качестве источников вариации изучаются межиндивидуальные различия (испытуемые), последовательность получения препаратов и различия между препаратами. Полученные значения сравниваются со значением остаточной вариации с учётом числа степеней свободы (DF). Результаты сравнения отражены в столбце F табл. 7. Для установления статистически значимых различий между средними значениями показателя биоэквивалентности сравниваемых препаратов значение F для строки «препарат» должно превзойти соответствующее табличное значение (таблица критерия Фишера для числа степеней свободы (1, n-2) и выбранного уровня значимости α). В нашем случае, для 18 добровольцев табличное значение F критическое равно 4,49 для 5% уровня значимости. Если рассчитанное значение F превосходит табличное значение, нулевая гипотеза об отсутствии значимых различий между средними значениями данного показателя биоэквивалентности может быть отброшена, а различия признаны статистически значимыми на соответствующем уровне значимости.

Рассчитывали парные критерии Стьюдента в предположении отсутствия влияния периода получения препарата и нормального распределения изучаемого показателя. Гипотеза биоэквивалентности принималась, когда 90% доверительный интервал для отношения среднего значения (μ_T/μ_R) логарифмически преобразованных данных AUC составлял $0,8 < \mu_T/\mu_R < 1,20$ и для C_{max} $0,7 < \mu_T/\mu_R < 1,43$. Границы, этих интервалов, рассчитывались при помощи дисперсионного анализа ANOVA. Расчёт 90% доверительных интервалов проводили с использованием программы Bioeqv [6].

Результаты и их обсуждение

На рис. 4 представлены усреднённые фармакокинетические кривые амиодарона в плазме крови

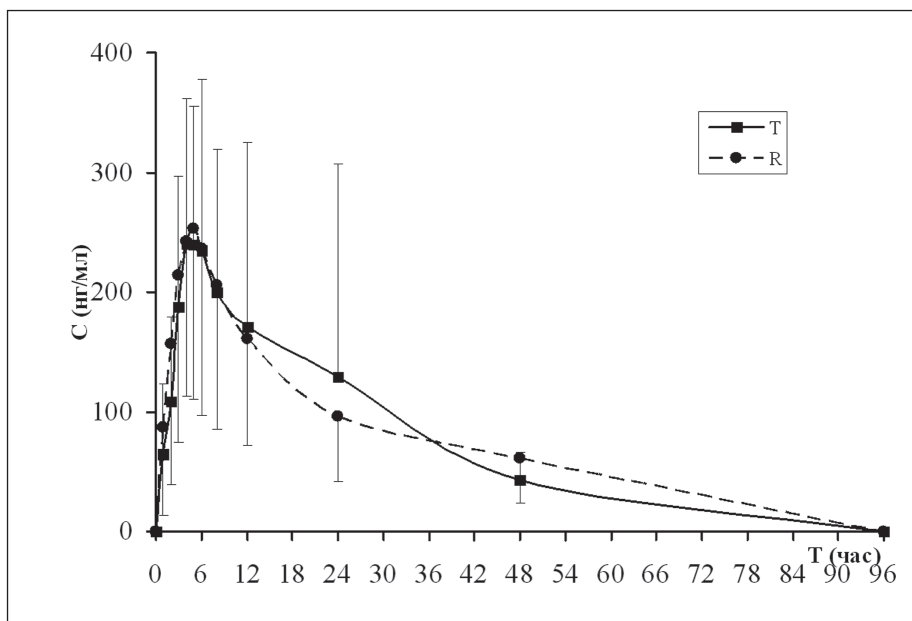


Рис. 3. Усреднённые кинетические кривые амиодарона в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток Сантодарона (Т) и таблеток Кордарона (R)

добровольцев после однократного приёма таблеток Сантодарона — Т и Кордарона — R, где анализируемое вещество определяется на протяжении 96 часов.

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 5) амиодарона для таблеток Сантодарона (Т) и таблеток Кордарона (R) показал, что изучаемые препараты медленно всасываются из желудочно-кишечного тракта и практически с одинаковой скоростью. Так параметр, характеризующий скорость всасывания — C_{max}/AUC_{0-t} для Т составил $0,049 \pm 0,019 \text{ ч}^{-1}$, и для R — $0,047 \pm 0,018 \text{ ч}^{-1}$, а время достижения максимальной концентрации (t_{max}) составило в среднем для Т — $6,2 \pm 4,7$ и для R — $5,7 \pm 2,0$ час соответственно. При этом средняя максимальная концентрация амиодарона, определяемая в плазме крови добровольцев (C_{max}), составила для препарата Т — $326,3 \pm 193,9 \text{ нг/мл}$ и для R — $305,6 \pm 146,2 \text{ нг/мл}$.

Анализ основного параметра, характеризующего степень и скорость биодоступности действующего вещества из лекарственной формы — AUC_{0-t} указывает на умеренную вариабельность данного параметра. Среднее значение AUC_{0-t} для препарата Т составило $7046,9 \pm 4866,4$ и для R — $7144,9 \pm 3357,0 \text{ нг/мл} \cdot \text{ч}$. При этом не выявлено достоверно значимых различий для сравниваемых величин.

Степень относительной биологической доступности амиодарона из таблеток Сантодарона по отношению к таблеткам Кордарона, определяемая отношением соответствующих значений AUC_{0-t} , составила в среднем $0,976 \pm 0,252$ (усреднённые данные на основании точечных индивидуальных оценок). Доверительный интервал

Таблица 5

Фармакокинетические параметры амиодарона у добровольцев после однократного приёма 200 мг Сантодарона (Т) и Кордарона (R)

Параметры	AUC _{0-t} (нг/мл·ч)		C _{max} (нг/мл)		t _{max} (ч)		C _{max} /AUC (ч ⁻¹)	
	Т	R	Т	R	Т	R	Т	R
$\bar{x}$	7046,9	7144,9	326,3	305,6	6,2	5,7	0,049	0,047
SD	4866,4	3357,0	193,9	146,2	4,7	2,0	0,019	0,018
$S_{\bar{x}}$	1147,7	791,8	45,7	34,5	1,1	0,5	0,004	0,004
C.V.%	69,1	47,0	59,4	47,8	75,7	35,4	37,8	38,3

для логарифмически преобразованных значений AUC_{0-t} составил 0,8636–1,0472. Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений C_{max}, составила 1,113±0,565, а доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений C_{max} — 0,8529–1,2108.

Полученные доверительные интервалы лежат в пределах, установленных «Методическими рекомендациями по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в РК», что говорит о биоэквивалентности исследуемых препаратов (табл. 6).

Таблица 6

90% доверительные интервалы отношения средних значений (μ_T/μ_R) AUC_{0-t}, C_{max} (логарифмически преобразованные данные), полученные на основе дисперсионного анализа (ANOVA)

Параметр	Нижнее значение	Среднее значение	Верхнее значение
AUC _{0-t}	0,8636	0,976	1,0472
C _{max}	0,8529	1,113	1,2108

Кроме того, на основании данных табл. 7 можно сделать вывод о достаточном числе испытуемых, участвующих в исследовании, поскольку табличное значение F критическое равно 4,49. В нашем случае, для ln AUC_{0-t} = 0,82950, а для ln C_{max} = 0,02575.

Заключение

Из результатов исследования относительной биологической доступности двух препаратов следует, что исследуемый препарат Сантодарон, таблетки, содержащие 200 мг амиодарона, производства АО «Химфарм», Республика Казахстан

Таблица 7

Результаты дисперсионного анализа фармакокинетических параметров (ln AUC_{0-t} и ln C_{max}), определяющих биодоступность фозиноприлата из таблеток

ln AUC _{0-t}				
Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,023	1	0,023	0,82950
Последовательность	0,003	1	0,003	0,12014
Испытуемые	8,927	17	0,525	19,14160
Остаточная вариация	0,439	16	0,027	—
Общая вариация	9,392	35	—	—

ln C _{max}				
Источник вариации	SS	DF	MS	F
Препарат	0,002	1	0,002	0,02575
Последовательность	0,000	1	0,000	0,00261
Испытуемые	8,026	17	0,472	5,20937
Остаточная вариация	1,450	16	0,091	—
Общая вариация	9,478	35	—	—

Примечания:

SS — сумма квадратов отклонений

MS — средний квадрат

DF — число степеней свободы

F — рассчитанное значение F-критерия Фишера (при уровне значимости $\alpha=5\%$)

является биоэквивалентным препарату сравнения Кордарон®, таблетки, содержащие 200 мг амиодарона, производства «Санофи Винтроп Индустрия», Франция.

С учётом основных положений доказательной медицины и фармации целесообразность проведения генерической замены (взаимозаменяемости) препарата Кордарон® препаратом Сантодарон является обоснованной.

Литература

1. *Гиляров М. Ю., Сулимов В. А.* Амiodарон: прошлое, настоящее и будущее. // Клиническая фармакология и терапия. 2006. Т. 15, № 4. С. 60–65.
2. Надлежащая клиническая практика, основные положения, СТ РК 1616–2006, Астана, 2006. с. 68.
3. Национальный стандарт Российской Федерации. Надлежащая клиническая практика, ГОСТ Р.52379–2005, Москва, 2005. с. 26.
4. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств. Москва, 2008; 32.
5. Проведение надлежащих исследований биоэквивалентности лекарственных средств в республике Казахстан, Астана, 2007. с.44.
6. *Сергиенко В. И., Джеллифф Р., Бондарева И. Б.* Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. Москва, Издательство РАМН, 2003. с. 208.
7. *Сычев К. С.* Практическое руководство по жидкостной хроматографии. 2010. с. 216.
8. Handbook For Good Clinical Research Practice (GCP): guidance for implementation, Printed in France, 2005. p. 132.
9. *Kollroser M., Schober C.* Determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry with an ion trap detector. Journal of Chromatography B. 2002. Vol. 766, P. 219–226.
10. *Pourbaix S., Berger Y., Desager J., Pacco M., and Harvengt C.* Absolute bioavailability of amiodarone in normal subjects. Clin Pharmacol Ther. 1985. Vol. 3, P. 118–123.

Исследование биоэквивалентности рилузола с использованием УЭЖХ–МС/МС метода

*Подпружников Ю. В.¹, Сабко В. Е.¹, Юрченко В. В.¹, Кравец Н. Н.¹,
Рыбьянова Л. П.¹, Зупанец И. А.², Безуглая Н. П.²*

¹ — Биоаналитическая лаборатория «Клифарм», Украина

² — Национальный фармацевтический университет, Украина

Резюме

Проведено сравнительное фармакокинетическое исследование препаратов Боризол®, таблетки 50 мг, производства ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ» и Рилутек®, таблетки 50 мг, фирмы «Aventis». Полученные результаты доказали биоэквивалентность сравниваемых препаратов. Исследование проведено с использованием оригинального метода количественного определения рилузола в плазме, основанного на сочетании обращённо-фазной ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (УЭЖХ–МС/МС). Метод отличается простотой пробоподготовки и экспрессностью. Валидация разработанного метода подтвердила соответствие его характеристик (селективность, нижний предел количественного определения, правильность, точность, возврат, стабильность) установленным требованиям.

Ключевые слова: рилузол, Боризол, Рилутек, биоэквивалентность, фармакокинетика, ультраэффективная жидкостная хроматография с МС/МС детектированием, боковой амиотрофический склероз, орфанные препараты, редкое заболевание

Введение

Рилузол, 2-амино-6- (трифторметокси) бензотиазол — единственное лекарственное средство на сегодня, которое одобрено FDA США для лечения бокового амиотрофического склероза. Этот препарат также получил высокую оценку ведущих российских и украинских специалистов [1, 2]. В Украине зарегистрирован и применяется в медицинской практике оригинальный препарат рилузола Рилутек®, таблетки 50 мг, фирмы «Aventis» (Франция). Генерическая копия указанного препарата, Боризол®, таблетки 50 мг производства ЗАО НПЦ «Борщаговский химико-фармацевтический завод», полученная из субстанции того же украинского производителя, проходит процедуру регистрации в Украине. Обеспечение практического здравоохранения орфанными препаратами является крайне важным, но, к сожалению, как отмечается в [3], процесс вывода на рынок таких препаратов в ЕС по сей день является неоправданно долгим. Не лучше ситуация с выводом на рынок орфанных препаратов и в странах СНГ. При ограниченных ресурсах особенно важно иметь в медикаментозном арсенале генерические лекарственные средства, биоэквивалентность которых оригинальным доказана проведением исследований в соответствии с современными регуляторными требованиями [4–6].

Первые исследования, доказывающие эффективность рилузола, описаны в [7]. Исследования фармакокинетики рилузола, проведённые на здоровых добровольцах и больных боковым амиотрофическим склерозом, описаны, соответственно, в [8–9]. В первом исследовании принимали участие 12 здоровых добровольцев, второе исследование было проведено на 100 больных в рамках III фазы клинических испытаний препарата. Оба исследования показали высокую межсубъектную вариабельность фармакокинетических (ФК) параметров препарата, детально проанализированную в [10].

В качестве аналитических методов при проведении фармакокинетических исследований рилузола главным образом использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) с УФ-детектированием [8–11]. При определении рилузола в тканях и биологических жидкостях животных в исследованиях [12, 13] также был использован метод ВЭЖХ с УФ-детектированием. Применение метода ВЭЖХ с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ–МС/МС) для количественного определения рилузола в плазме крови было описано лишь в 2010 году в [14]. При этом при пробоподготовки авторы использовали трудоёмкую и продолжительную процедуру жидкость-жидкостной экстракции с дальнейшим упариванием экстракта досуха и последующим

перерастворением остатка. Выбранные авторами условия хроматографии вызывают сомнения в их воспроизводимости, поскольку аналит и внутренний стандарт не удерживаются на колонке, а выходят в «мёртвом объёме».

Таким образом, исследование биоэквивалентности препарата «Боризол», таблетки 50 мг по отношению к оригинальному препарату «Рилутек», таблетки, 50 мг, выполненное с использованием простого и экспрессного метода, основанного на осаждении белков плазмы органическим растворителем с последующим анализом надосадочной жидкости новейшим методом ультраэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемным масс-селективным детектированием (УЭЖХ–МС/МС), безусловно, является актуальным.

Экспериментальная часть

Реактивы, растворители и материалы

Стандартный образец рилузола (РИЛ), 99,05%, препарата Боризол®, таблетки 50 мг, производства ЗАО НПЦ «Борщаговский химико-фармацевтический завод», серия 61008 и препарата Рилутек®, таблетки 50 мг, фирмы «Aventis», серия 7CH3C, были предоставлены ЗАО НПЦ «Борщаговский химико-фармацевтический завод», Украина.

Трифлорметоксианилин (ТФМА), 99,05%, производства фирмы Changzhou Friendship (Китай), серия 030410, использовали как внутренний стандарт.

Использовали метанол (99,9%) и ацетонитрил (99,9%) квалификации «для ВЭЖХ» производства фирмы LAB-SCAN, изопропанол (99,8%) квалификации «для ВЭЖХ» производства фирмы CHROMASOLV, кислоту муравьиную (98–100%) квалификации «чда» фирмы Riedel-de-Haen. Воду очищенную получали на установке «Elix-35» (фирма Millipore, USA), финишную очистку воды проводили на установке «Milli-Q Gradient» (фирма Millipore, USA).

Все другие используемые реактивы были аналитической квалификации. Человеческая плазма, свободная от лекарственных препаратов, полученная от здоровых добровольцев, с сертификатами качества на каждую серию, была предоставлена ОАО «Биофарма», Украина. Плазму хранили при температуре не выше минус 30 °С до использования.

Приборы и методы

УЭЖХ–МС/МС анализ был проведён с использованием хроматографа «Waters Acquity UPLC®» на колонке «Waters ACQUITY UPLC® BEH C18» (50 мм × 2.1 мм, размер зерна 1.7 мкм) (Милфорд, США) в комбинации с тандемным квадрупольным

масс-селективным детектором «Quattro microTM API» (Micromass, Манчестер, Англия), оснащённым электроспрей-интерфейсом. Для контроля оборудования и обработки хроматографических данных использовалось программное обеспечение MassLynx 4.1.

Хроматографирование проводили при 40 °С при скорости подвижной фазы 0,4 мл/мин. Стартовая подвижная фаза содержала 60% элюента А (ацетонитрил — вода — кислота муравьиная в соотношении объёмов 10: 90: 0,2) и 40% элюента В (ацетонитрил — кислота муравьиная в соотношении 100: 0,2). В течение 0,7 мин применяли линейный градиент до соотношения 27:73 элюента А к В. Затем подвижная фаза немедленно приводилась к 100% содержанию элюента В и удерживалась в таком состоянии до 1,2 мин, после чего немедленно устанавливались стартовые условия подвижной фазы. Температура автосамплера была 10 °С, объём вводимой пробы — 15 мкл.

Детектирование проводили в режиме регистрации положительных ионов. Параметры детектора составляли: температура источника 140 °С, напряжение на капилляре 3200 В, температура десольватации 500 °С, расход газа десольватации (азот, 99,5%) 550 л/час, давление инертного газа для получения дочерних ионов (аргон, 99,99%) 3.5 мкБар.

Детектирование образующихся ионов было проведено в режиме MRM (multiple reaction monitoring mode) с использованием ионных переходов с m/z 234.96→138.0 для РИЛ и 178.0→92.08 для ТФМА. Энергия соударения составляла 45 эВ и 30 эВ, напряжение на конусе — 36 эВ и 16 эВ для РИЛ и ТФМА, соответственно. Параметры MRM-метода были определены с помощью опции автоматической оптимизации прибора.

Приготовление образцов

Приготовление стандартных калибровочных и QC растворов. Стандартный образец около 10 мг РИЛ или 4 мг ТФМА точно взвешивали, помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в метаноле при использовании ультразвуковой бани, доводили объём раствора указанным растворителем до метки и тщательно перемешивали (основной раствор).

Растворы РИЛ для приготовления калибровочных растворов готовили методом соответствующего разбавления основного раствора, используя в качестве растворителя водный раствор, содержащий 0,1% муравьиной кислоты и 20% ацетонитрила (AcN). При этом получали растворы с концентрациями РИЛ 20; 60; 200; 500; 1500; 3000; 6000 нг/мл.

Растворы РИЛ для приготовления QC-образцов готовили из основного раствора стандартного образца аналогично приготовлению ка-

либровочных растворов, при этом получали растворы с концентрациями аналита 60 нг/мл, 3000 нг/мл и 5000 нг/мл.

Раствор ТФМА готовили путём разбавления основного раствора, используя в качестве растворителя 1% раствор кислоты муравьиной в метаноле, при этом получали раствор с концентрацией ТФМА 20000 нг/мл. Растворы хранили при температуре от +2 до +7 °С.

Калибровочные растворы и растворы контроля качества (QC-образцы) готовили на плазме, прибавляя к 200 мкл blankовой плазмы, помещённой в пробирки Эппендорф (1,5 мл), по 20 мкл соответствующего раствора РИЛ и ТФМА. Содержимое перемешивали на мешалке Vortex Genius 3 в течение 20 с и далее проводили подготовку пробы, как это указано ниже в разделе «приготовление биообразцов», начиная с прибавления 500 мкл 1% раствора кислоты муравьиной в AcN.

Приготовление биообразцов. В пробирку Эппендорф (1,5 мл) помещали 200 мкл биообразца (аликвоты плазмы крови добровольца), прибавляли 20 мкл раствора ТФМА и перемешивали содержимое на мешалке Vortex 20 с. К полученному раствору прибавляли 500 мкл 1% раствора муравьиной кислоты в AcN и содержимое вновь перемешивали на Vortex. Пробирки помещали в предварительно охлаждённую до 10 °С центрифугу (Sigma 3K30C) и центрифугировали при 20000 об./мин в течение 10 мин. По 300 мкл надосадочной жидкости из каждой пробирки переносили в вials, содержащие по 300 мкл 0,1% раствора муравьиной кислоты в воде, перемешивали их содержимое на мешалке Vortex и передавали на этап хроматографирования.

Валидация метода. Была проведена полная валидация разработанного метода определения РИЛ в соответствии с требованиями руководства [15]. Валидация включала следующие параметры: селективность, нижний предел количественного определения, калибровочная кривая, внутрипрогонная и межпрогонная точность и правильность, возврат (степень извлечения), стабильность.

Для определения селективности использовали модельные биообразцы на 3-х сериях blankовой плазмы, в которую вводили РИЛ в количестве, соответствующем НПКО (2 нг/мл в пересчёте на содержание в плазме), и ТФМА, получая концентрацию последнего 2000 нг/мл в пересчёте на плазму. Растворы из модельных биообразцов и образцов blankовой плазмы без введения дополнительных ингредиентов, приготовленные так, как описано выше, хроматографировали и сравнивали площади пиков на соответствующих хроматограммах.

Для определения нижнего предела количественного определения использовали 5 модельных биообразцов, приготовленных на blankовой плазме, с введённой концентрацией РИЛ, равной 2 нг/мл в пересчёте на плазму. Хроматографировали полученные растворы и растворы blankовой плазмы, обработанные, как указано в разделе «Приготовление биообразцов».

Для определения параметра «Калибровочная кривая» использовали 7 калибровочных растворов с концентрациями РИЛ 20; 60; 200; 500; 1500; 3000; 6000 нг/мл в пересчёте на плазму. Каждый раствор содержал 2000 нг/мл ТФМА в пересчёте на плазму.

Для оценки параметров «Точность» и «Правильность» готовили по 5 модельных биообразцов для каждой из 3-х концентраций РИЛ в пересчёте на плазму: 6; 300 и 500 нг/мл. Эксперимент проводили в три разных рабочих дня. Внутрипрогонная и межпрогонная точность была рассчитана по формуле:

$$R.S.D. = (S.D./M) (100), \text{ где}$$

M — средняя экспериментально определённая концентрация

S.D. — стандартное отклонение *M*

Правильность была определена как относительная ошибка, её рассчитывали с использованием формулы:

$$RE = (E - T) (100/T), \text{ где}$$

E — экспериментально определённая концентрация

T — номинальная концентрация

Для оценки степени извлечения были приготовлены по 3 модельных биообразца, содержащие РИЛ на каждом из 3-х концентрационных уровней: низком, среднем и высоком, и ТФМА с концентрацией 2000 нг/мл в пересчёте на плазму. Сравнивали площади пиков в хроматограммах растворов, приготовленных в соответствии с методикой, и растворов, полученных внесением растворов аналитов в обработанную blankовую плазму после экстракции.

В соответствии с регуляторными требованиями было проведено тестирование всех видов стабильности, предусмотренных для биоаналитических методик [15]: кратковременная стабильность, стабильность при замораживании-оттаивании, пост-препаративная стабильность, долговременная температурная стабильность, стабильность основных растворов РИЛ и ТФМА. Все модельные биообразцы для исследования стабильности

были приготовлены на бланковой плазме с внесением в неё соответствующего количества растворов РИЛ и ТФМА. Кратковременная стабильность была исследована при размораживании образцов и их выдерживании при комнатной температуре в течение 4-х часов, после чего образцы были проанализированы. Было проведено 3 цикла замораживания-оттаивания образцов для двух разных уровней концентраций РИЛ, после чего был проведён количественный анализ.

Долговременную стабильность проверяли после хранения в течение 175 суток при температуре не выше минус 70 °С модельных образцов, содержащих РИЛ в номинальных концентрациях 6 и 400 нг/мл. Стабильность хроматографируемых растворов в автосамплере была изучена после хранения в течение 26 часов, стабильность основных растворов РИЛ и ТФМА — после хранения в течение 5 месяцев и 23 суток, соответственно.

Исследование биоэквивалентности. Клиническое исследование по изучению биоэквивалентности препаратов «Боризол» и «Рилутек» (таблетки 50 мг), содержащих рилузол, было проведено в строгом соответствии с требованиями протокола, этическими принципами Хельсинской декларации, требованиями GCP и GLP. В данное исследование было включено 26 здоровых добровольцев обоего пола (10 женщин, что составило 38,5% и 16 мужчин, соответственно 61,5%). Средний возраст добровольцев — $32,3 \pm 1,87$ лет.

Дизайн исследования: сравнительное, рандомизированное, перекрёстное с двумя периодами и двумя последовательностями исследование по изучению биоэквивалентности при введении добровольцам натошак однократной дозы каждого из сравниваемых препаратов, с «ослеплением» аналитического этапа исследования и статистической обработки результатов. Все добровольцы получали однократно натошак препарат в дозе 50 мг (1 таблетка) в каждый период исследования.

У каждого из добровольцев было отобрано по 15 проб крови в каждом из периодов исследования. Пробы отбирали в пластиковые вакуумные пробирки, объёмом 9 мл, обработанные гепарином лития. Отбор проб крови производили согласно следующему графику — 0 ч (до приёма препарата), через 15 мин; 30 мин; 1 ч; 1 ч 30 мин; 2 ч; 3 ч; 4 ч; 6 ч; 8 ч; 12 ч; 15 ч; 24 ч; 30 и 36 часов после приёма препарата. Пробы не более чем через 2 минуты после отбора крови помещали в центрифугу. Центрифугирование проводили в течение 5 минут при 3000 g. Плазму делили на 2 аликвоты (1-я — для анализа, 2-я — контрольная) по 1,6 мл каждая, которые помещали в отдельные предварительно промаркированные криоконтейнеры (тубы). Плазма и в клинической базе, и в биоаналитической лаборатории хранилась при температуре не выше минус 70 °С.

Промежуток времени между забором крови и помещением плазмы в морозильную камеру не превышал 12 мин.

Образцы для анализа (общее количество 780 образцов) были переданы с клинической базы в биоаналитическую лабораторию «Клифарм» в криобоксах в замороженном виде во вторичных криоконтейнерах, заполненных «сухим льдом» (твёрдым диоксидом углерода).

Дизайном исследования было предусмотрено «ослепление» биообразцов для биоаналитической лаборатории: маркировка биообразцов содержала код препарата — буквы «А» или «В», при этом какой из препаратов является тестовым, а какой референтным, информацию при проведении анализа и обработке его результатов лаборатория не имела.

С использованием разработанного УЭЖХ-МС/МС метода в биообразцах было проведено количественное определение РИЛ.

По полученным результатам были построены фармакокинетические профили для каждого добровольца в обоих периодах. Фактические значения фармакокинетических параметров $C_{\max}$ и $T_{\max}$ были определены из первичных данных рутинного анализа с применением элементарной статистики.

Последующую статистическую обработку фармакокинетических (ФК) данных проводили с использованием программы Win-Nonlin версии 5.2 (Pharsight, Mountain View, CA, USA) способом внемоделного расчёта с прямой статистической обработкой по методу «NCA Model 200». Значения площадей под фармакокинетическими кривыми AUC_{0-36} были вычислены с использованием метода линейных трапеций. Площадь под кривой при экстраполяции её до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) была вычислена с использованием указанного программного продукта. Константа элиминации K_{el} , была определена путём линейной регрессии после логарифмического преобразования данных, был определён также период полувыведения ($t_{1/2}$).

Вывод о биоэквивалентности был сделан с использованием подхода, основанного на 90% доверительных интервалах для отношения средних значений параметров $C_{\max}$ и AUC_{0-t} для препарата А и препарата В, оценённых при выполнении процедуры статистического анализа. Препараты считали биоэквивалентными, если 90% доверительный интервал для отношения их средних значений $C_{\max}$ и AUC_{0-t} находился в пределах 0,80–1,25 (80–125%).

Результаты и их обсуждение

Разработка биоаналитической методики. В биоаналитических методиках чувствительность, точность и правильность количественного определения аналита подвержены большому влиянию случайных и систематических факторов. Такое

влияние наблюдается как в процессе пробоподготовки (экстракция, упаривание, сорбция и десорбция и др.) и хроматографирования, так и на этапе масс-селективного детектирования. В последнем случае кроме обычных погрешностей, критическим фактором становится дрейф чувствительности масс-детектора. Для компенсации описанных факторов при проведении фармакокинетических исследований в раствор биообразца обычно вводят внутренний стандарт (ВС) перед началом количественного анализа. Это позволяет увеличить правильность и точность методик, добиться соблюдения критериев приемлемости при валидации метода и дальнейшем рутинном анализе [15]. В связи с этим, очень важным является правильный выбор внутреннего стандарта.

ВС, используемый в УЭЖХ–МС/МС (или ВЭЖХ–МС/МС) количественном анализе по отношению к аналиту должен иметь близкие физико-химические свойства (липофильность, растворимость, кислотно-основные свойства), подобное хроматографическое поведение, близкую молекулярную массу. Специфическим требованием к ВС, используемым в фармакокинетических исследованиях, является отсутствие его в бланковой биоматрице (отсутствие на эндогенном уровне).

Перечисленные требования идеально выполняются, если в качестве ВС используются дейтерированные или меченые изотопами других элементов аналиты. К сожалению, зачастую осуществить это достаточно трудно, т.к. коммерчески доступный ассортимент таких веществ очень мал.

Следующими по полноте соответствия вышеперечисленным требованиям можно рекомендовать в качестве ВС изомеры аналитов. Однако здесь есть опасение, что даже «суперселективный» tandemный масс-селективный детектор не обеспечит необходимой селективности определения ВС и аналита на стадии образования их дочерних ионов.

Нами в качестве ВС для количественного определения РИЛ в плазме крови был выбран ТФМА.

Как видно из структурных формул аналита и ВС, приведённых на рис. 1, они достаточно схожи, и можно ожидать от них сходного хроматографического поведения.

Известные до проведения нашего исследования методы пробоподготовки при определении рилузола в биологических матрицах гораздо более длительны и трудоёмки. В [13] при пробоподготовке проводят экстракцию этилацетатом с дальнейшим упариванием досуха в токе азота и перерастворением остатка в подвижной фазе. В работе [14] для выделения рилузола из плазмы использовали экстракцию *трет*-бутилметилловым эфиром, с дальнейшим упариванием супернатанта досуха в токе азота и перерастворением его в смеси 0,1% кислота муравьиная — AcN (10:90). Для выделения рилузола из плазмы и нервной ткани мышей в работе [12] использовали предварительную экстракцию на картридже C₈ с дальнейшим элюированием и определением методом ВЭЖХ.

Для осаждения белков и других веществ, мешающих количественному определению РИЛ, нами был использован ацетонитрил, содержащий 1% кислоты муравьиной. Как показали наши исследования, при этом достигается необходимая селективность и чувствительность методики. После центрифугирования аликвоту супернатанта отбирают и разбавляют таким же количеством 0,1% раствора муравьиной кислоты в воде для приближения состава растворителя пробы к стартовому составу элюента при градиентном элюировании. Указанный метод пробоподготовки, впервые предложенный нами для определения рилузола в плазме, существенно отличается от ранее описанных простотой и экспрессностью.

Для хроматографического определения использовалась обращённо-фазная колонка «Waters ACQUITY UPLC® ВЕН C18». Хроматографирование проводили в градиентном режиме, что позволило получить вполне симметричные пики аналита и ВС. Время удерживания аналита составило

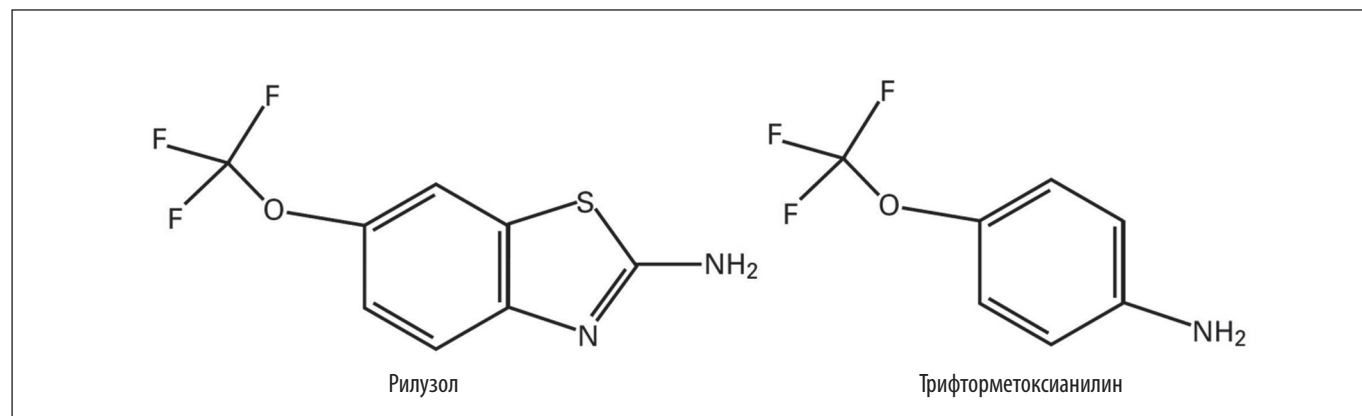


Рис. 1. Химические структуры рилузола и трифторметоксианилина

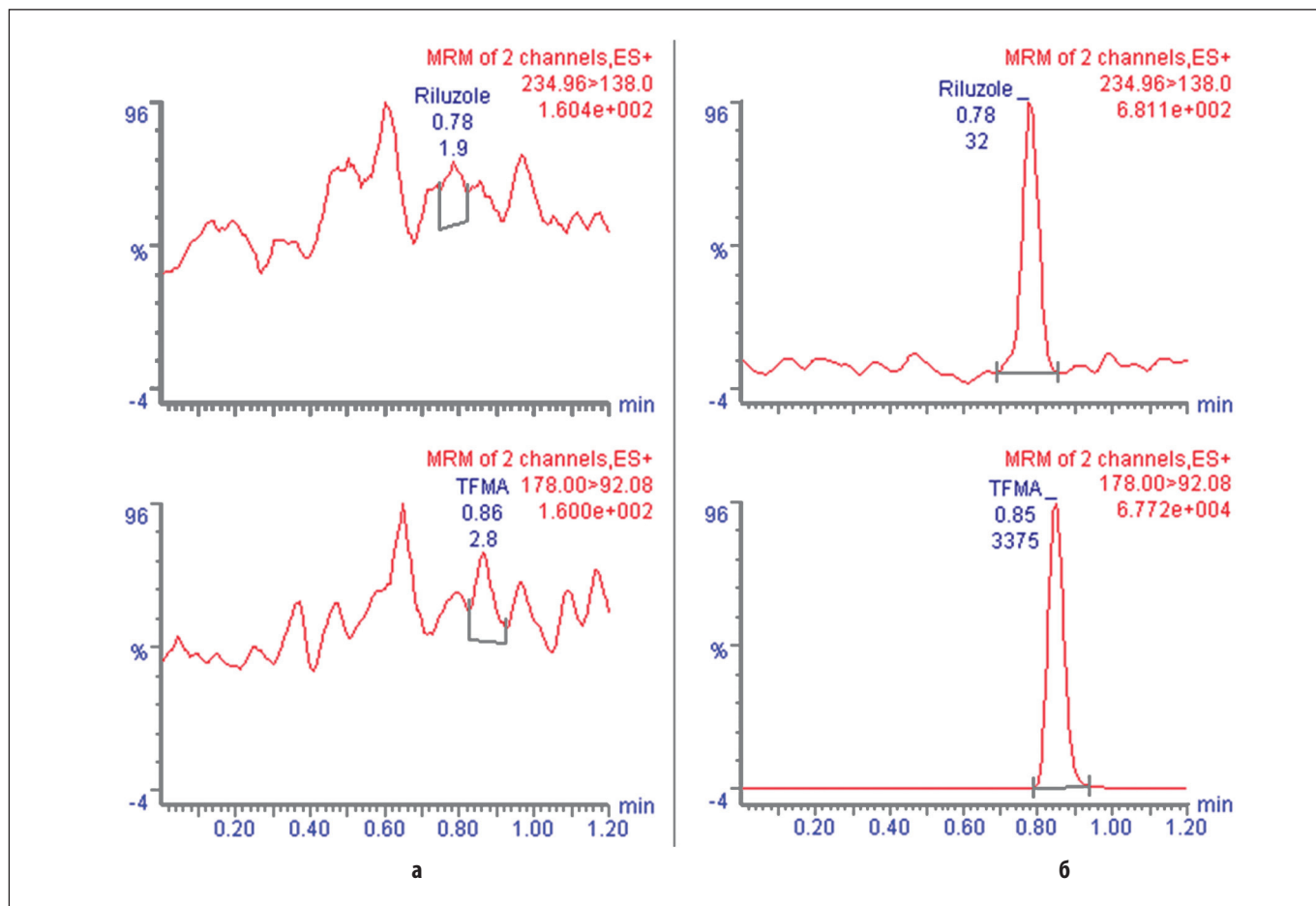


Рис. 2. Хроматограммы растворов blank-плазмы (а) и blank-плазмы с введёнными в неё 2 нг/мл рилузола (НПКО) и 2000 нг/мл внутреннего стандарта трифторметоксианилина (TFMA) (б)

0,79 мин, ВС — 0,85 мин. Время регистрации данных составляло 1,2 мин. С учётом времени отбора пробы время, необходимое для записи одной хроматограммы, не превышало 2 мин.

Малые затраты времени на хроматографию позволили каждый исследуемый образец хроматографировать дважды, улучшив тем самым метрологические характеристики метода. Результат определения концентрации РИЛ рассчитывали для среднего значения отклика двух параллельных инъекций. Значительное уменьшение времени хроматографирования в методе УЭЖХ по сравнению с традиционной ВЭЖХ является неоспоримым преимуществом нового метода. Особенно существенно это при проведении фармакокинетических исследований.

Были установлены оптимальные параметры для МС/МС детектирования РИЛ и ТФМА в выбранных хроматографических условиях. Хроматограммы растворов из blank-плазмы без введения в неё аналита и ВС, а также с введёнными в неё указанными веществами, приведены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, РИЛ и ТФМА не мешают компоненты плазмы, при этом приведённая

хроматограмма отвечает содержанию аналита на уровне нижнего предела количественного определения (2 нг/мл в плазме).

В данном исследовании было проанализировано 780 биообразцов, что составляло 13 аналитических прогонов. В каждом из прогонов готовили 7 калибровочных, 6 QC-растворов, по 1 раствору Z-образца и blank, таким образом, общее количество образцов при рутинном анализе, не считая этапов разработки и валидации метода, составило 975.

Валидация методики

Селективность. Были исследованы образцы blank-плазмы из 3-х разных источников. На каждой из этих видов плазмы было приготовлено по 2 blank-образца, а также по 2 модельных биообразца, содержащих РИЛ с концентрацией 2 нг/мл и внутренний стандарт с концентрацией 2000 нг/мл.

Средние отношения площади пика «шума» к площади пика аналита (РИЛ) для 3-х исследованных образцов плазмы составили 14,9, 8,7

и 11,5%, соответственно, что удовлетворяет установленному критерию (< 20%).

Калибровочная кривая и нижний предел количественного определения. Калибровочная кривая была построена по приготовленным на бланковой плазме 7 калибровочным растворам СО РИЛ в диапазоне концентраций 2–600 нг/мл в пересчёте на плазму. Результаты измерений бланковых растворов и растворов нуль-образцов не принимались во внимание при расчёте параметров регрессионного уравнения. Наиболее адекватно калибровочная кривая описывается уравнением первого порядка с весовой функцией $1/x$ (т.е., $1/\text{концентрация}$).

Коэффициенты регрессионного уравнения калибровочной прямой $Y = a \cdot X + b$ имели значение: $a = 0,0030419$, $b = 0,00132343$;

Коэффициент корреляции имел значение: $r = 0,999$.

Отклонения найденных значений концентраций от введённых удовлетворяли критериям приемлемости [15].

Нами было провалидировано значение нижнего предела количественного определения 2 нг/мл. Для этого были проанализированы 5 независимых модельных биообразцов с указанной концентрацией и 5 бланковых биообразцов. Среднее соотношение сигнал/шум составило 9,2, концентрация РИЛ была найдена с правильностью 1,6% и точностью 8,6%, что удовлетворяет требованиям FDA — не более 20% [15].

Правильность, точность. Определения, выполненные на 5 модельных биообразцах на каждом из 3-х выбранных уровней концентраций QC-образцов показало, что правильность, а также

внутридневная и междневная точность (табл. 1), удовлетворяют критериям приемлемости — не более 15% [15].

Степень извлечения (recovery). Было установлено, что степень извлечения РИЛ из плазмы составляет: 106,8% для концентрации 6 нг/мл, 96,4% для концентрации 300 нг/мл и 95,8% для концентрации 500 нг/мл. Таким образом, среднее значение степени извлечения РИЛ составило 99,7%. Среднее значение степени извлечения ТФМА составило 93,5%.

Изучение стабильности. Было проведено тестирование всех видов стабильности, предусмотренных для биоаналитических методик [15].

Результаты тестирования показали их соответствие установленным критериям приемлемости [15]. Было подтверждено, что модельные биообразцы стабильны в течение 175 суток хранения при температуре не выше минус 70 °С. Срок хранения реальных биообразцов до проведения анализа составлял 171 сут.

Исследование фармакокинетики

На рис. 3 приведены усреднённые фармакокинетические кривые 26 добровольцев после введения тестового и референтного препаратов перорально. Как видно из рис. 3, препарат Боризол®, таблетки 50 мг, производства ЗАО НПЦ «Борщевский химико-фармацевтический завод» даёт сходный фармакокинетический профиль с препаратом Рилутек®, таблетки 50 мг, производства фирмы «Aventis».

В данном исследовании не зарегистрировано ни одной побочной реакции или побочного яв-

Таблица 1

Внутридневные и междневные точность и правильность методики количественного определения рилулоза в плазме

		Введено рилулоза (нг/мл)	Найдено рилулоза (нг/мл)	RSD (%)	RE (%)
Внутридневные	День 1, n=5	5.969	6.496	3.7%	8.8
		298.5	302.7	3.8%	1.4
		497.4	465.5	2.7%	–6.4
	День 2, n=5	5.969	6.323	5.0%	5.9
		298.5	328.9	3.1%	10.2
		497.4	515.1	3.6%	3.5
	День 3, n=5	5.969	6.408	6.6%	7.4
		298.5	300.3	4.3%	0.6
		497.4	455.7	6.2%	–8.4
Междневные	3 дня, n=15	5.969	6.409	5.0%	7.4
		298.5	310.6	5.5%	4.1
		497.4	478.7	6.9%	–3.8

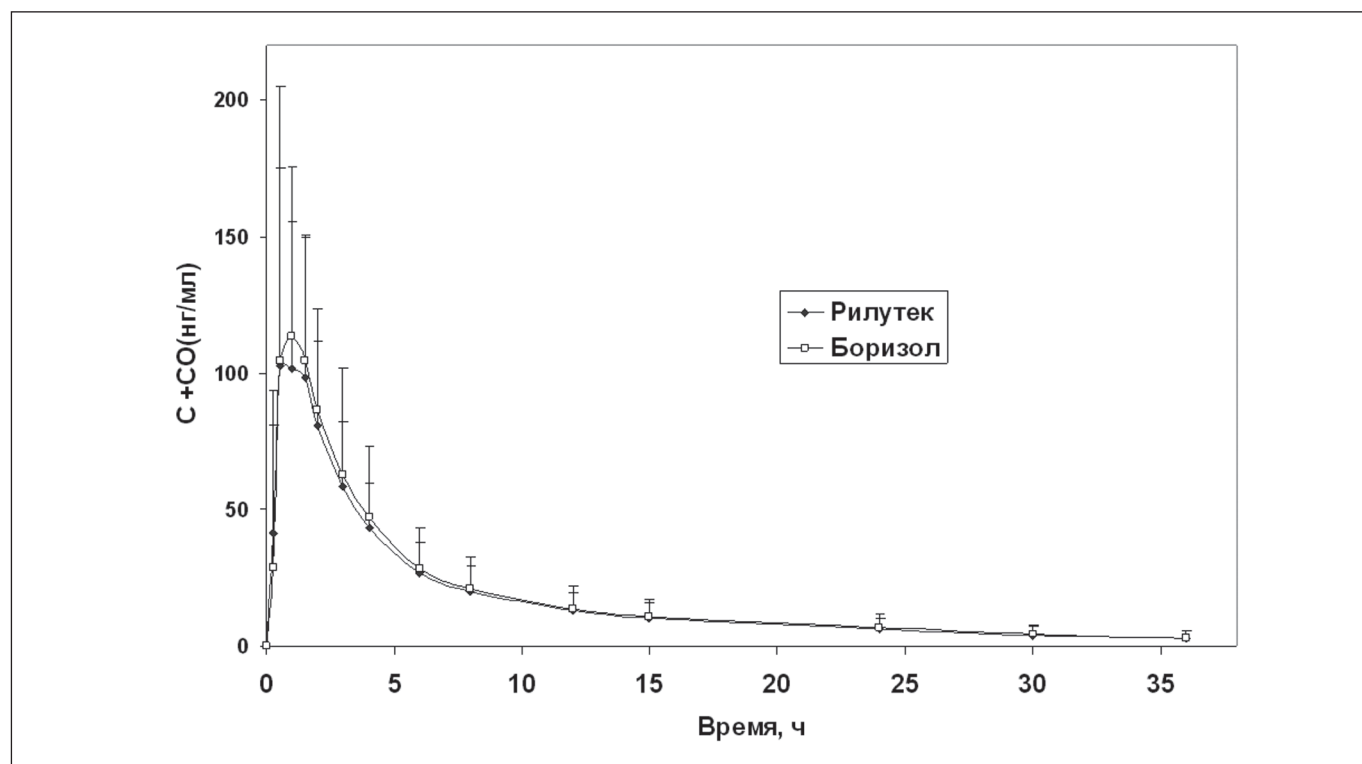


Рис. 3. Усреднённые профили «концентрации и их стандартные отклонения — время» после однократного перорального приёма препаратов 26 здоровыми добровольцами

ления, относящегося к категории серьёзных. Оба препарата сопоставимы по профилю переносимости.

Статистическую обработку проводили с использованием алгоритма ANOVA (программное обеспечение Win-Nonlin professional software version 5.2). Основные фармакокинетические параметры и их стандартные отклонения приведены в табл. 2.

Таблица 2

Средние фармакокинетические параметры рилузола и их стандартные отклонения для 26 добровольцев после однократного перорального введения тестового и референтного препаратов (таблетки 50 мг)

Параметр	Боризол®	Рилутек®
$C_{\max}$ (нг/мл)	151,0±90,1	138,0±64,2
$t_{\max}$ (h)	1,13±0,59	0,95±0,66
AUC_{0-t} (ч·нг/мл)	668,8±334,8	630,2±273,1
$AUC_{0-\infty}$ (ч·нг/мл)	737,7±369,2	699,0±318,4
$AUC_{0-t} / AUC_{0-\infty}$ (%)	90,65±3,11	90,53±4,36
K_{el} (ч ⁻¹)	0,061±0,013	0,069±0,026
$t_{1/2}$ (ч)	11,78±2,44	11,22±3,77

После однократного приёма натошак (после 12-часового голодания) тестового препарата Боризол®, таблетки 50 мг и референтного препарата Рилутек®, таблетки 50 мг, максимальный уровень кривой «концентрация—время» достигался, соответственно, через 1,13 ч и 0,95 ч. Средние значе-

ния максимальной концентрации ($C_{\max}$) рилузола составили 151,0 нг/мл и 138,0 нг/мл для тестового и референтного препаратов, соответственно. При этом необходимо отметить достаточно высокую межсубъектную вариабельность для обоих препаратов. Средние значения площади под фармакокинетической кривой AUC_{0-t} составили для Боризола — 668,8 и для Рилутека — 630,17 ч·нг/мл. Экстраполированная $AUC_{0-\infty}$ для тестового и референтного препаратов составили, соответственно, 737,7 и 699,0 ч·нг/мл (в обоих случаях процентное отношение AUC_{0-t} к $AUC_{0-\infty}$ было больше 90% (90,65% и 90,53%). Константы элиминации, как и другие ФК-параметры, для тестового и референтного препаратов статистически не различались и составили — 0,061 и 0,069, соответственно. Период полувыведения ($t_{1/2}$) препаратов составил — 11,78 ч для Боризола и 11,22 ч для Рилутека.

В табл. 3 приведены данные по оценке биоэквивалентности изучаемых препаратов. Как видно из этих данных, отношение средних максимальных концентраций тестового и референтного препаратов составляет 109,4% при относительном доверительном интервале 91,43–119,9%, аналогичное отношение средних площадей — 106,1% при их вариабельности 97,19–114,9%, что соответствует критериям приемлемости (80–125%). Таким образом, на основании проведенного исследования можно сделать вывод о том, что препарат Боризол®, таблетки 50 мг, произ-

Таблица 3

Результаты изучения биоэквивалентности препаратов Боризол® (А) и Рилутек® (В)

Препарат	$C_{\max}$, нг/мл	$\frac{C_{\max A}}{C_{\max B}}$, %	$\Delta C_{\max}$, %	AUC_{0-t}	$\frac{AUC_{0-t} A}{AUC_{0-t} B}$, %	ΔAUC_{0-t} , %
Боризол®	151,0	109,4	91,43–119,9	668,8	106,1	97,19–114,9
Рилутек®	138,0			630,2		

водства ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ» биоэквивалентен препарату Рилутек®, таблетки 50 мг, производства «Aventis» при введении перорально натошак однократной дозы здоровым добровольцам.

Выводы

Проведено сравнительное фармакокинетическое исследование генерического препарата Боризол®, таблетки 50 мг, производства ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ» и оригинального препарата Рилутек®, таблетки 50 мг, фирмы «Aventis», кото-

рое подтвердило биоэквивалентность сравниваемых препаратов.

Для проведения исследования был разработан и провалидирован в соответствии с установленными международными требованиями оригинальный метод определения рилузона в плазме крови. Метод отличается простотой и экспрессностью, поскольку он основан на одностадийной преципитации белков плазмы органическим растворителем с последующим анализом супернатанта новейшим методом ультраэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemным масс-селективным детектированием.

Литература

- Боковой амиотрофический склероз / под ред. И. А. Завалишина. М.: ГЭОТАР, Медиа, 2009. 272 с.
- Данилов Н. Н. Фармакотерапия при боковом амиотрофическом склерозе. Український медичний часопис. 2004. Т. IX/X, 5. С. 61–66.
- Joppi R., Bertele V., Garattini S. Orphan drug development is progressing too slowly. Br J Clin Pharmacol 2006. Vol 61 (3). P. 355–360.
- CPMP/EWP/QWP/1401/98 Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products — Evaluation of Medicines in Human Use; 2001.
- Guidance for Industry Bioequivalence guidance. U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine (CVM); November 8, 2006.
- Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. WHO Technical Report Series, No. 937, Annex 7. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Fortieth report. Geneva, World Health Organization; 2006.
- Wagner M. L., Landis B. E. Riluzole: a new agent for amyotrophic lateral sclerosis. Ann Pharmacother. 1997. Vol. 31 (6), P. 738–744.
- Le Liboux A., Lefebvre P., Le Roux Y., Truffinet P., Aubeneau M., Kirkesseli S., et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of riluzole in white subjects. J Clin Pharmacol 1997; Vol. 37 (9). P. 820–827.
- Bruno R., Vivier N., Montay G., Le Liboux A., Powe L. K., Delumeau J. C., et al. Population pharmacokinetics of riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Clin Pharmacol Ther 1997. Vol. 62 (5). P. 518–526.
- Groeneveld G. J., van Kan H. J. M., Tora o J. S., Veldink J. H., Guchelaar H. — J., Wokke J. H. J., et al. Inter- and intraindividual variability of riluzole serum concentration in patients with ALS. J Neurol Sci 2001. 191. P. 121–125.
- van Kan H. J. M., Spieksma M., Groeneveld G. J., Tora o J. S., van den Berg L. H., Guchelaar H. J. A validated HPLC assay to monitor riluzole plasma or serum concentrations in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Biomed Chromatogr 2004. Vol. 18 (9). P. 723–6.
- Colovic M., Zennaro E., Caccia S. Liquid chromatographic assay for riluzole in mouse plasma and central nervous system tissues. J Chromatogr. B 2004. Vol. 803. P. 305–309.
- Maltese A., Maugeri F., Drago F., Bucolo C. Simple determination of riluzole in rat brain by high-performance liquid chromatography and spectrophotometric detection. J Chromatogr. B 2005. Vol. 817. P. 331–334.
- Chandu B. R., Nama S., Kanala K., Challa B. R., Shaik R. P., Khagga M. Quantitative estimation of riluzole in human plasma by LC-ESI-MS/MS and its application to a bioequivalence study. Anal Bioanal Chem 2010. Vol. 398. P. 1367–1374.
- Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research (CDER), Centre for Veterinary Medicine (CVM); May 2001.

Список условных обозначений

AUC	– площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время»;	f	– относительная степень всасывания лекарственного средства, определяемая отношением $AUC_{t,T}/AUC_{t,R}$ или $AUC_{t,ss,R}/AUC_{t,ss,R}$;
AUC_t	– площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время» в интервале времени от 0 до момента (t) отбора последней пробы биоматериала;	f_∞	– отношение $C_{max,T}/C_{max,R}$;
AUC_∞	– площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время» в интервале времени от 0 до ∞;	K_{el}	– константа элиминации лекарственного средства;
AUC_{t,ss}	– площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время» в пределах интервала дозирования в стационарных условиях (ss) при многократном введении лекарственного средства;	R	– препарат сравнения;
C	– концентрация действующего вещества;	T	– исследуемый препарат;
C_{max}	– максимальная концентрация действующего вещества;	t	– время от момента приема (введения) лекарственного препарата;
C_{min}	– минимальная концентрация действующего вещества;	t_{max}	– время достижения максимальной концентрации действующего вещества;
C_{ss}	– средняя концентрация действующего вещества в стационарных условиях;	T_{1/2}	– период полувыведения лекарственного средства;
C_t	– концентрация действующего вещества в момент t;	T>C_{ss}	– период времени, в течение которого концентрация лекарственного средства превышает C _{ss} ;
CV	– коэффициент вариации;	T>75%C_{max}	– период времени, в течение которого концентрация лекарственного средства превышает 75% от C _{max} ;
f	– относительная степень всасывания (относительная биодоступность) лекарственного средства, определяемая отношением $AUC_{∞,T}/AUC_{∞,R}$;	μ_T	– генеральное среднее показателя для исследуемого препарата;
		μ_R	– генеральное среднее показателя для препарата сравнения;
		σ²	– средний квадрат «ошибки», или остаточная внутрииндивидуальная вариация;
		τ	– интервал дозирования.

Уважаемые коллеги!

Редакция журнала заинтересована в публикации результатов Ваших работ.

Для размещения статьи в журнале необходимо выслать нам письмо на адрес zherdevpharm@mail.ru со следующими данными:

1. Фамилия Имя Отчество (полностью)
2. Фотография(и) для размещения информации об авторах на сайте (желательно до 2 Мбайт и в формате jpeg). Файл с фотографией необходимо назвать: ФИО полностью на русском, например, Утин_Дмитрий_Владимирович.jpg. Файлы в другом формате не принимаются
3. Должность: зав. кафедрой, профессор кафедры, ассистент, доцент, м.н.с., с.н.с., Руководитель центра или клиники, зав. отделением, Президент, Вице-президент,

Генеральный директор, Исполнительный директор, Главный редактор, Ответственный секретарь, Начмед и т.п.

4. Статус: к.м.н., к.х.н., к.ф.н., д.м.н., д.х.н., д.ф.н., профессор, член-корр., академик и т.п. (если нет, то нет)
5. Перечислить область деятельности (специализацию): например, педиатрия, эпидемиология, неврология, клиническая фармакология, нейрофизиология...
6. Членство в медицинских Обществах (российских, международных)
7. Членство в редакциях других журналах
8. Почтовый адрес для переписки: индекс, город, страна, место работы, адрес для переписки журналов
9. Личный e-mail адрес
10. Телефон для быстрой связи (с кодом города)
11. Web-адрес Вашего сайта или сайта учреждения, где Вы работаете (если он есть)

12. Другие данные, которые Вы хотите разместить: например, Правительственные награды, заслуженный врач и т.п.
13. Название Рубрики, куда Вы хотите поместить статью(и):
 - Передовая статья
 - Теоретические основы
 - Фармакодинамические исследования
 - Фармакокинетические исследования
 - Биофармацевтические исследования
 - Исследования биотрансформации
 - Исследования биоэквивалентности
 - Популяционная фармакокинетика
 - Терапевтический лекарственный мониторинг
 - Фармакогенетика
 - Нанофармакология
 - Практические рекомендации

Если статья не подходит к рубрикам журнала, то просто выберите другой журнал или свяжитесь с редакцией.

Не забывайте прикрепить саму рукопись в формате MS WORD с рисунками и таблицами внутри статьи, или отдельными файлами. Можно не архивировать до 10 Мбайт (если архивируете, то делайте это в WinZIP, а Том архива разбивайте частями до 10 Мбайт в WinRAR).

В Теме письма сделайте пометку: В редакцию журнала «Фармакокинетика и Фармакодинамика» от ФИО, краткое название статьи.

После получения Вашего письма, содержащего всю вышеперечисленную информацию, статья попадает в редакцию журнала, которая после рецензирования принимает решение о целесообразности её публикации.

О дальнейшей судьбе статьи мы незамедлительно Вам сообщим, либо по указанному кон-

тактному телефону для быстрой связи, либо по личному e-mail.

В случае если возникнет необходимость исправить или доработать статью, мы отправим Вам текст предложений для внесения соответствующих изменений.

Автору, статья которого не была принята к публикации, отправляется мотивированный отказ. Помните, что отклонили статью, а не Вас.

Сразу после рецензирования, одобрения редакцией, коррекции, редакции, решения главного редактора «В ПЕЧАТЬ» и вёрстки журнала, статья будет размещена в on-line доступе на сайте, а pdf версию мы перешлём на Ваш личный e-mail.

Авторские экземпляры будут высланы Вам после выхода журнала из типографии на указанный почтовый адрес для переписки.

Требования к статьям для журнала «Фармакокинетика и Фармакодинамика»

Статья должна быть написана на основе следующих правил:

- «Единых требований к статьям, представляемым в биомедицинские журналы» [International committee of medical journal editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann Intern Med 1997;126:36-47.]
- «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления» ГОСТ Р 7.0.5-2008

Ознакомиться с ними можно на сайте журнала: <http://pharmacokinetica.ru/text.php?pg=11>

По всем возникающим у Вас вопросам обращайтесь к Жердеву Владимиру Павловичу

☎ +7 (495) 601-21-57, e-mail: zherdevpharm@mail.ru

✉ 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8

ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН



ПОДПИСКА НА 2013 ГОД

Клиническая фармация

Дайджест фармацевтических и медицинских новостей

Ежеквартальный журнал «Клиническая фармация» посвящён вопросам развития фармацевтического рынка, сфокусированным на его госпитальном секторе.

Издание предназначено для повышения квалификации, и как рабочий инструмент для зав. больничных аптек, зав. отделений, клинических провизоров, врачей-клинических фармакологов, главных врачей больниц, начмедов, организаторов здравоохранения, начальников тендерных отделов, служащих государственных регуляторных органов, управленческого звена лечебных учреждений, лиц, принимающих решения

о закупках лекарственных средств или включении их в формуляры стационаров, перечни для обеспечения препаратами льготных категорий населения, а также сотрудников фармацевтических компаний.

Через редакцию Вы можете оформить подписку на журнал.

Стоимость годовой подписки на 2013 г. 5 920 рублей (НДС не облагается).

За дополнительной информацией обращайтесь в отдел подписки ООО «Издательство ОКИ»

к Елене Афанасьевой по:

телефону: **+7 (916) 986-04-65**

e-mail: **eva88@list.ru**

сайт: **www.clinical-pharmacy.ru**

СЧЁТ № КФ/2013

Наименование заказчика (или Ф.И.О.):

ИНН (юрлица):

Адрес доставки с индексом:

Телефон (с кодом города):

Платательщик:

№	Наименование товара	Единица измерения	Кол-во	Цена, руб.	Сумма, руб.
1	Годовая подписка на журнал «Клиническая фармация» 2013 г.	комплект	1	5 920,00	5 920,00

Итого:

5 920,00

М.П.



К оплате: *пять тысяч девятьсот двадцать руб. 00 коп.*
НДС не облагается на основании пункта 2, статьи 346.11, глава 26.2 НК РФ

Руководитель предприятия _____

(Белоусов Д.Ю.)

ОБРАЗЕЦ ЗАПОЛНЕНИЯ ПЛАТЁЖНОГО ПОРУЧЕНИЯ

Получатель: ИНН / КПП 7721253233 / 772101001 ООО «Издательство ОКИ»	Расч. сч. №	40702810838360029819
Банк получателя:	БИК	044525225
В ОАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. Москва	Корр. сч. №	30101810400000000225

ПОДПИСКА НА 2013 ГОД

Качественная клиническая практика

Рецензируемый медицинский журнал

Публикует материалы по планированию и проведению клинических исследований лекарственных средств, фармакоэкономике, фармако-эпидемиологии, биомедицинской этике, фармаконадзору, которые используются в преподавательской работе во многих медицинских ВУЗах.

Через редакцию Вы можете оформить подписку на журнал.
Стоимость годовой подписки на 2013 г. 1920 рублей (НДС не облагается).

За дополнительной информацией обращайтесь в отдел подписки ООО «Издательство ОКИ» к Елене Афанасьевой по:

телефону: **+7 (916) 986-04-65**

e-mail: **eva88@list.ru**

сайт: **www.ClinVest.ru**



СЧЁТ № ККП/2013					
Наименование заказчика (или Ф.И.О.):					
ИНН (юрлица):					
Адрес доставки с индексом:					
Телефон (с кодом города):					
Платательщик:					
№	Наименование товара	Единица измерения	Кол-во	Цена, руб.	Сумма, руб.
1	Годовая подписка на журнал «Качественная клиническая практика» 2013 г.	комплект	1	1920,00	1920,00
Итого:					1920,00
м.п.		К оплате: <i>Одна тысяча девятьсот двадцать руб. 00 коп.</i> НДС не облагается на основании пункта 2, статьи 346.11, глава 26.2 НК РФ Руководитель предприятия _____ (Белоусов Д.Ю.)			



ОБРАЗЕЦ ЗАПОЛНЕНИЯ ПЛАТЁЖНОГО ПОРУЧЕНИЯ

Получатель: ИНН / КПП 7721253233 / 772101001 ООО «Издательство ОКИ»	Расч. сч. №	40702810838360029819	
Банк получателя:	БИК	044525225	
В ОАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. Москва	Корр. сч. №	30101810400000000225	