

ФАРМАКОКИНЕТИКА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ НАНОСИСТЕМЫ КЕТОПРОФЕНА ДЛЯ ИНГАЛЯЦИОННОГО ВВЕДЕНИЯ

М. В. Карлина, В. М. Косман, О. Н. Пожарицкая, А. Н. Шиков, В. Г. Макаров¹

Представлены результаты исследования фармакокинетики наносистемы кетопрофена после однократного эндотрахеального введения беспородным крысам-самцам. Для определения кетопрофена в плазме крови и органах разработан и валидирован метод ВЭЖХ-УФ. Введение кетопрофена эндотрахеально в виде наносистемы приводит к быстрому попаданию действующего вещества в системный кровоток, через 15 мин после введения концентрация достигает максимума. Наибольшая концентрация действующего вещества наблюдается в месте введения, а именно в легких, проникновение кетопрофена в сильно васкуляризованные ткани характеризуется средней степенью интенсивности, в ткани со средней степенью васкуляризации кетопрофен поступает в незначительном количестве. При эндотрахеальном введении наносистемы кетопрофен преодолевает гематоэнцефалический барьер в небольшом количестве.

Ключевые слова: кетопрофен; наносистема; эндотрахеальное введение; фармакокинетика; распределение в тканях; ВЭЖХ; крысы.

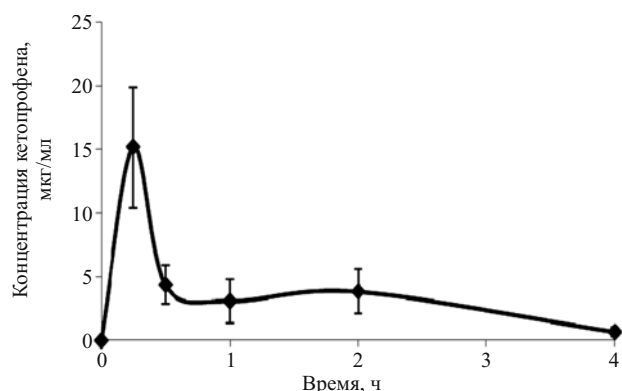
ВВЕДЕНИЕ

Создание новых аэрозольных форм биологически активных веществ является одной из современных тенденций развития фармацевтики. В настоящее время аэрозольная терапия широко используется для лечения различных бронхолегочных заболеваний [4, 5, 10]. Доставка лекарственных веществ непосредственно в легкие позволяет быстро достичь необходимых терапевтических концентраций препарата в органе-мишени, снизить его системное воздействие и выраженность побочных эффектов, позволяет избежать эффекта первого прохождения через печень, проблемы метаболизма в желудочно-кишечном тракте [8, 9].

Кетопрофен — препарат, относящийся к группе нестероидных противовоспалительных средств, обладает выраженным обезболивающим, жаропонижающим и противовоспалительным действием. Лизиновую соль кетопрофена предложено использовать в комплексной терапии острых респираторных инфекций, протекающих с лихорадкой и болевым синдромом [2]. Разработаны наночастицы с кетопрофена лизинатом для снятия воспаления при кистозном фиброзе (муковисцидозе) для ингаляционного введения [11]. Особенностью кетопрофена является его удовлетворительная переносимость и высокая безопасность, что было продемонстрировано во многих контролируемых исследованиях. Серьезные нежелательные явления, которые приводят к отмене препарата, встречаются лишь у 3–4 % больных и обусловлены преимущественно воздействием на слизистую желудочно-кишечного тракта [1]. Таким образом, разработка ингаляционных лекарственных форм кетопрофена, позволяющих избежать перорального его введения, для использования в комплексной терапии различных бронхолегочных заболеваний является актуальной.

С использованием оригинального подхода нами разработана наносистема кетопрофена для ингаляционного введения. Изучение фармакокинетики лекарственных веществ и учет их фармакокинетических параметров является необходимым этапом в комплексе доклинических исследований, т.к. данные, полученные в ходе изучения фармакокинетики, позволяют объективно качественно и количественно оценить преимущества и недостатки того или иного пути введения создаваемого препарата. В связи с вышесказанным целью данного исследования было изучение фармакоки-

нетического кетопрофена в плазме крови крыс после однократного эндотрахеального введения наносистемы ($n = 5, \bar{X} \pm S\bar{x}$).



Фармакокинетическая кривая кетопрофена в плазме крови крыс после однократного эндотрахеального введения наносистемы ($n = 5, \bar{X} \pm S\bar{x}$).

¹ Санкт-Петербургский институт фармации, Россия, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, корп. 245, тел./факс (812) 603-24-33; e-mail: spbpharm@mail.ru

Таблица 1. Валидационные параметры методик определения кетопрофена в плазме крови и печени крыс

Параметр	Значение в плазме	Значение в печени
Линейность (Linearity) и аналитическая область (Range), мкг/мл	0,08 – 65,50	0,07 – 50,00
Уравнение регрессии*	$Y = 82793X - 297$	$Y = 90056X - 505$
Коэффициент корреляции r	0,9993	0,9997
Степень экстракции (Recovery), %	93,5	103,0
Точность (Accuracy), %	0,9 – 6,4	0,2 – 10,1
Прецизионность (Precision), %	3,2 – 5,3	2,0 – 4,2
Предел обнаружения (LOD), мкг/мл	0,08	0,07

* Y — площадь пика кетопрофена, X — концентрация кетопрофена, мкг/г.

нетики и распределения кетопрофена в органах и тканях животных при однократном эндотрахеальном введении разработанной наносистемы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали 30 аутобредных белых крыс-самцов массой 220 – 250 г (Питомник лабораторных животных РАМН “Рапполово”), которые содержались в стандартных условиях вивария со световым режимом 12 ч света и 12 ч темноты на полнораационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 53434-2009), согласованном с “Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей” и одобрены на заседании биоэтической комиссии Санкт-Петербургского института фармации (заключение биоэтической комиссии № 5.17/14 от 05.06.2014 г.).

Наносистему кетопрофена получали методом замены растворителя аналогично описанному ранее [7]: кетопрофен растворяли в спирте этиловом, вспомогательные вещества (лактоза) растворяли в воде, раствор кетопрофена вводили в эквивалентном (по массе) количестве в раствор вспомогательных веществ, растворитель отгоняли в вакууме (роторный испаритель ИКА, Германия) до получения суспензии, полученную суспензию высушивали лиофильно (сушилка лиофильная ЛС 1000, Россия). Полученный лиофилизат измельчали в ступке, размер полученных частиц, определенный методом электрофоретического рассеивания света, составил (310 ± 9) нм.

Наносистему кетопрофена вводили в дозе 8 мг кетопрофена/кг однократно эндотрахеально с помощью аэрозоллера для мелких лабораторных животных

(Penn-Century Inc., USA). Животных умерщвляли в CO_2 -камере, пробы крови и органы (легкие, печень, мышцы, почки, сердце, мозг) отбирали через 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 ч после однократного введения препарата. Количество животных на одну временную точку — 5. Образцы крови помещали в гепаринизированные пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин для получения плазмы. Плазму и органы замораживали и хранили до анализа при температуре -20°C .

Подготовка плазмы крови к анализу

В пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл (типа “Эппендорф”) помещали 0,2 мл плазмы крови, прибавляли 0,6 мл ацетонитрила, встряхивали с помощью вортекса в течение 30 с, затем пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин, надсадочную жидкость отделяли, растворитель удаляли, сухой остаток обрабатывали 0,2 мл метанола при встряхивании с помощью вортекса в течение 30 с для растворения аналита, пробу переносили в виалу для автосамплера и дозировали в ВЭЖХ-систему.

Подготовка органов к анализу

Размороженный орган помещали в стеклянный стакан, взвешивали, прибавляли воду очищенную в массо-объемном соотношении 1:1 и гомогенизировали с помощью измельчителя тканей Polytron PT-MR 1600E (Kinematic AG, Швейцария). 0,4 мл полученного гомогената переносили в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 2 мл (типа “Эппендорф”), прибавляли 1,2 мл ацетонитрила, встряхивали с помощью вортекса в течение 30 с, затем пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин, надсадочную жидкость отделяли, растворитель удаляли, сухой остаток обрабатывали 0,2 мл метанола при встряхивании с помощью вортекса в течение 30 с для растворения аналита, пробу переносили в виалу для автосамплера и дозировали в ВЭЖХ-систему.

Таблица 2. Показатели фармакокинетики кетопрофена у крыс при однократном эндотрахеальном введении наносистемы, $\bar{X} \pm S\bar{x}$

C_{max} , мкг/мл	AUC_{0-1} , ч · мкг/мл	$AUC_{0-\infty}$, ч · мкг/мл	$AUMC_{0-\infty}$, мкг · ч ² /мл	MRT , ч	$T_{1/2}$, ч	T_{max} , ч
$15,14 \pm 4,75$	$14,12 \pm 3,21$	$16,71 \pm 3,61$	$39,61 \pm 2,16$	$2,20 \pm 0,90$	$2,07 \pm 0,75$	$0,25 \pm 0,00$

Таблица 3. Содержание кетопрофена (мкг/г) в органах крыс после однократного эндотрахеального введения исследуемой наносистемы, $\bar{X} \pm S\bar{x}$

Время, ч	Легкие	Печень	Мышцы	Сердце	Почки	Мозг
0,25	18,73 ± 6,19	0,49 ± 0,12	0,28 ± 0,05	1,02 ± 0,25	2,65 ± 0,48	0,30 ± 0,04
0,5	2,51 ± 0,71	0,42 ± 0,14	0,21 ± 0,02	1,09 ± 0,35	1,20 ± 0,21	0,14 ± 0,07
1	3,94 ± 1,59	1,43 ± 0,06	0,13 ± 0,04	0,32 ± 0,08	1,43 ± 0,42	0,10 ± 0,01
2	4,84 ± 1,29	1,02 ± 0,25	0,26 ± ,06	0,39 ± 0,05	0,97 ± 0,56	0,06 ± 0,03
4	3,91 ± 1,76	0,65 ± 0,06	0,05 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,26 ± 0,13	0,00

Условия ВЭЖХ-анализа кетопрофена

Анализ выполнен на хроматографе высокого давления фирмы Shimadzu (Япония) с диодно-матричным детектором и колонкой Luna C₁₈ (2) 4,6 · 150 мм (размер частиц сорбента 5 мкм, Phenomenex, США) и предколонкой (3 мм), заполненной тем же сорбентом, в изократическом режиме элюирования смесью 0,03 % раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) и ацетонитрила в соотношении 50:50 (v:v), скорость подачи элюента 1,0 мл/мин, объём пробы 20 мкл, длина волны детектирования 254 нм.

Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с использованием программного обеспечения LabSolution (Shimadzu, Япония).

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. В таблицах приведены средние арифметические значения (\bar{X}), соответствующие им стандартные ошибки среднего значения ($S\bar{x}$). Параметры фармакокинетики рассчитаны методом статистических моментов с использованием приложения PKSolver для Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа биологических проб плазмы разработана методика количественного определения кетопрофена, которая валидирована в соответствии с современными требованиями ИСН. Методика адаптирована для анализа проб органов и ревалидирована на примере проб печени. Основные валидационные параметры методик приведены в табл. 1.

Разработанные и валидированные методики применили для анализа проб плазмы крови и органов крыс, полученных при проведении фармакокинетического эксперимента.

Для оценки фармакокинетических свойств кетопрофена наносистему вводили эндотрахеально в одной дозе — 8 мг кетопрофена/кг. Полученные результаты приведены на рисунке.

Кетопрофен при эндотрахеальном введении исследуемой наносистемы быстро поступает в кровеносное русло, через 15 мин после введения концентрация анализа в плазме достигает своего максимума. Далее наблюдается достаточно быстрое снижение концентрации анализа в плазме крови, уже через полчаса его концентрация составляет около 30 % от максимальной. Во временном интервале 0,5 – 2 ч концентрация кетопрофена не претерпевает статистически значимых изменений, к 4 ч концентрация анализа в плазме крови составляет 4 % от значения максимальной концентрации.

Основные фармакокинетические параметры, рассчитанные методом статистических моментов, приведены в табл. 2, где C_{max} — максимальная концентрация действующего вещества в плазме крови, AUC_{0-t} — площадь под фармакокинетической кривой в плазме крови от 0 до 4 ч, $AUC_{0-\infty}$ — площадь под фармакокинетической кривой в плазме крови от 0 до полного удаления действующего вещества из организма, $AUC_{0-\infty}$ — суммарная площадь под кривой произведения времени на концентрацию действующего вещества, MRT — среднее время удержания действующего вещества в организме, $T_{1/2}$ — период полувыведения,

Таблица 4. Основные показатели проникновения кетопрофена в органы крыс при однократном введении исследуемой наносистемы, $\bar{X} \pm S\bar{x}$

Орган	AUC_{0-t} , мкг · ч/г	MRT_T , ч	$T_{1/2T}$, ч	f_t
Легкие	19,74 ± 5,34	15,95 ± 7,52	11,06 ± 5,19	1,40
Печень	3,54 ± 0,45	4,79 ± 0,99	2,93 ± 0,61	0,25
Мышцы	0,56 ± 0,12	2,36 ± 0,78	1,58 ± 0,61	0,04
Сердце	1,65 ± 0,34	2,95 ± 0,95	2,21 ± 0,54	0,12
Почки	3,87 ± 0,92	1,85 ± 0,64	1,29 ± 0,55	0,27
Мозг	0,24 ± 0,03	1,58 ± 0,56	0,93 ± 0,35	0,02

AUC_{0-t} — площадь под фармакокинетической кривой в органе от 0 до 4 ч;

MRT_T — среднее время удержания действующего вещества в органе;

$T_{1/2T}$ — период полувыведения действующего вещества из органа;

f_t — тканевая доступность.

T_{\max} — время достижения максимальной концентрации действующего вещества в плазме крови.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что введение кетопрофена эндотрахеально в виде наносистемы приводит к быстрому попаданию действующего вещества в системный кровоток, значения MRT и $T_{1/2}$ свидетельствуют о быстром выведении анализа из плазмы, что характерно для кетопрофена и при других путях введения. Так при внутривенном введении кетопрофена крысам в исследовании [6] значение $T_{1/2}$ составило 3,02 ч. В работе [3] при введении кетопрофена *per os* крысам в дозе 10 мг/кг значение параметра C_{\max} составило 11,76 мкг/мл, что сопоставимо с данными, полученными в настоящем исследовании, и позволяет предположить интенсивное и достаточно полное всасывание действующего вещества, т.к. известно, что при пероральном приеме кетопрофен обладает высокой биодоступностью.

Для наносистемы кетопрофена изучали накопление действующего вещества в тканях легких, а также распределение в ткани печени, мышц, почек, сердца и мозга (табл. 3).

Полученные данные позволяют сделать вывод о быстром распределении кетопрофена во все исследованные органы. Уже на первой временной точке во всех изученных тканях достигается максимальная концентрация анализа. Концентрации действующего вещества в тканях легких несколько выше, чем в плазме крови, однако не имеют статистически значимых отличий за исключением точки 4 ч.

Интенсивность проникновения кетопрофена в периферические ткани характеризуется тканевой доступностью (f), определяемой как отношение значения AUC в ткани (AUC_T) к соответствующей величине AUC в плазме, а также значением периода полувыведения и среднего времени удержания ($T_{1/2}$, T и MRT_T). Рассчитанные параметры приведены в табл. 4.

Значения рассчитанных параметров свидетельствуют о накоплении кетопрофена в месте введения — в легких. Проникновение кетопрофена в сильно васкуляризованные ткани печени, почек и сердца характеризуется средней степенью интенсивности. В ткани со средней степенью васкуляризации (мышцы) кето-

профен поступает в незначительном количестве. При эндотрахеальном введении наносистемы кетопрофен преодолевает гематоэнцефалический барьер в небольшом количестве (около 2 %).

ВЫВОД

При однократном эндотрахеальном введении кетопрофена в виде наносистемы действующее вещество быстро попадает в системный кровоток ($T_{\max} = 15$ мин) и распределяется с различной степенью интенсивности во все изученные органы. Эндотрахеальное введение наносистемы позволяет создать высокие концентрации кетопрофена в легких, сопоставимые с концентрацией анализа в плазме крови, при этом скорость выведения действующего вещества из тканей легких значительно ниже, чем из плазмы крови. Поэтому перспективным является дальнейшее изучение наносистемы кетопрофена при ее эндотрахеальном введении для использования в комплексной терапии бронхолегочных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Бадюкин, *Conciliium Med.*, № 4, 53 – 56 (2007).
2. Т. А. Крючкова, *Вопр. соврем. педиатрии*, **12**(2), 127 – 130 (2013).
3. J. C. Aguilar-Carrasco, J. Rodriguez-Silverio, J. M. Jiménez-Andrade, et al., *Drug Dev. Res.*, **75**(3), 189 – 194 (2014).
4. M. M. Bailey, & C. J. Berkland, *Med. Res. Rev.*, **29**(1), 196 – 212 (2009).
5. F. Gagnadoux, A. L. Pape, E. Lemarie, et al., *Eur. Respir. J.*, **26**(4), 657 – 661 (2005).
6. H. B. He, X. Tang, F. D. Yao, *Xue Xue Bao*, **41**(5), 452 – 456 (2006).
7. M. V. Karlina, O. N. Pozharitskaya, A. N. Shikov, et al., *Pharm. Chem. J.*, **44**(9), 501 – 503 (2010).
8. C. Marianecchi, L. D. Marzio, F. Rinaldi, et al., *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, **2**(5), 567 – 575 (2011).
9. T. Ozeki, T. Tagami, *Asian J. Pharm. Sci.*, **9**(5), 236 – 243 (2014).
10. C. A. Ruge, J. Kirch, & C. M. Lehr, *Lancet Respir. Med.*, **1**(5), 402 – 413 (2013).
11. M. Stigliani, R. P. Aquino, P. Del Gaudio, et al., *Int. J. Pharm.*, **448**(1), 198 – 204 (2013).

Поступила 09.03.16

EXPERIMENTAL STUDY OF PHARMACOKINETICS OF KETOPROFEN NANOSYSTEM FOR INHALATION ADMINISTRATION

M. V. Karlina, V. M. Kosman, O. N. Pozharitskaya, A. N. Shikov, and V. G. Makarov

St. Petersburg Institute of Pharmacy, ul. Zavodskaya 3/245, P. O. Kuzmolovo, Vsevolozhsky district, Leningrad oblast, 188663 Russia;

* e-mail: spbpharm@mail.ru

Pharmacokinetics of ketoprofen nanosystem was studied in outbred rats after single endotracheal administration. Ketoprofen was analyzed in blood serum and tissues by HPLC with UV detection. After endotracheal administration of the nanosystem, ketoprofen rapidly appears in systemic blood flow and its concentration in blood serum reaches maximum after 15 min. The maximum drug concentration in tissues was observed near the site of introduction, namely, in lungs. Ketoprofen showed moderate penetration in tissues with high vascularization, and weak penetration in tissues with moderate vascularization. After endotracheal administration of the nanosystem, only small amount of ketoprofen overcomes the blood brain barrier.

Keywords: ketoprofen; nanosystem; endotracheal administration; pharmacokinetics; drug distribution in tissues; HPLC; rats.