Биомедицина • № 1, 2016, С. 108–116

Изучение сравнительной фармакокинетики препаратов, содержащих розувастатин

Л.М. Красных[1], В.В. Смирнов[1, 2], О.А. Горошко[1], Е.А. Егоренков[2], Г.Ф. Василенко[1], Г.В. Раменская[1, 2], А.Е. Петухов[2]

[1] – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва
[2] – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.фарм.н. Горошко Ольга Александровна, olga_goroshko@mail.ru

Проведено исследование сравнительной фармакокинетики препаратов, содержащих розувастатин в дозе 20 мг. Определение концентрации розувастатина в плазме крови добровольцев осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Подобраны условия хроматографического разделения, условия экстракции и количественного определения розувастатина в плазме крови. Для исследуемых препаратов рассчитаны основные фармакокинетические параметры: $AUC_{0-\infty}$, C_{max}, T_{max}, C_{max}/AUC. 90% доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений $AUC_{0-\infty}$ составил 81,5-106,0 и для C_{max} – 86,3-106,1. По результатам исследования был сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов.

Ключевые слова: розувастатин, фармакокинетика, биоэквивалентность.

Введение

Известно, что гиперхолестеринемия является важным фактором риска развития ишемической болезни сердца (ИБС). Основной группой препаратов для коррекции и снижения риска сердечно-сосудистых осложнений являются статины [2, 6]. Актуальность проблемы гиперхолестеринемии подтверждает тот факт, что у лиц старше 50-ти лет частота ее встречаемости составляет около 75% [4, 5].

На международном рынке имеется множество препаратов группы статинов. В последнее время повышенный интерес исследователей привлекает розувастатин, что сделало его одним из наиболее изученных статинов [9]. Данный препарат, являющийся гиполипидемическим средством IV поколения, реализуется на фармацевтическом рынке с 2003 г. В отличие от ловастатина, симвастатина и аторвастатина, он подвергается минимальному метаболизму в печени. В настоящее время розувастатин имеет наилучший профиль безопасности среди статинов. Гиполипидемическое действие прямо пропорционально величине назначенной дозы. Терапевтический эффект появляется в течение 1-й недели после назначения терапии, через 2 недели достигает 90% от максимального. Максимальный эффект обычно достигается к 4-й неделе и после этого остается постоянным [7, 8].

Цель работы – исследование сравнительной фармакокинетики препаратов, содержащих розувастатин.

Оценка биоэквивалентности проводилась путем определения концентрации розувастатина в плазме крови

добровольцев с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием.

Материалы и методы

Исследуемые препараты

Для настоящего исследования были выбраны препараты розувастатина – таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, в дозе 20 мг. В качестве референтного препарата (РП) использован препарат розувастатина компании-оригинатора. Исследуемый препарат: воспроизведенное лекарственное средство (ВЛС).

Дизайн исследования

Дизайн исследования соответствовал утвержденному протоколу и требованиям «Надлежащей клинической практики» [1]. Данное исследование проведено по открытой рандомизированной перекрестной схеме в два этапа с двумя последовательностями приема исследуемого препарата (ВЛС) и препарата сравнения (РП), натощак, в условиях клинического центра на 28-ми здоровых добровольцах в возрасте 18-45 лет, включенных в исследование после подписания информированного согласия и проведения медицинского обследования. Скрининговое обследование включало получение демографических данных, данных медицинского и медикаментозного анамнеза, проведение физикального осмотра, включающего измерение роста и массы тела, основных жизненных показателей (артериального давления, частоты сердечных сокращений), регистрацию электрокардиограммы, общие анализы крови и мочи, биохимический анализ крови с определением концентраций глюкозы, общего билирубина, креатинина, активности печеночных аминотрансфераз (АЛТ, АСТ) и щелочной фосфатазы. Все участники были проверены на наличие в организме наркотических веществ и алкоголя, кроме того, волонтерам-женщинам был проведен тест на беременность. Вопрос о включении добровольцев в исследование решался на основе собранной информации с учетом критериев включения и невключения. Все клинически значимые отклонения определяемых параметров безопасности от диапазона нормальных значений регистрировались как нежелательные явления.

Исследование состояло из двух равнозначных этапов. Перед приемом препарата на I этапе исследования добровольцы распределялись на две группы случайным образом, согласно схеме рандомизации. Добровольцы, вошедшие в первую группу, принимали ВЛС; вошедшие во вторую группу – РП. На II этапе исследования схема была представлена наоборот.

Приготовление образцов для анализа

Отбор образцов крови на каждом этапе исследования осуществлялся до приема препаратов и через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24, 48 и 72 ч после приема препаратов. Образцы крови помещали в пробирки с гепарином и выдерживали 10 мин при комнатной температуре. После центрифугирования (3000 об./мин в течение 10 мин) отделенную плазму помещали в маркированные пробирки. До момента анализа все образцы хранились при температуре -35ºС.

Для приготовления стандартного раствора розувастатина с помощью аналитических весов с точностью до 0,0001 г брали навеску, содержащую 10

мг розувастатина, количественно переносили ее в мерную колбу и растворяли в деионизированной воде, доводя объем раствора до метки 100 мл. Концентрация розувастатина в полученном растворе составляла 100 мкг/мл. Из данного раствора путем дальнейшего разведения получали растворы с концентрациями розувастатина 1 мкг/мл, 100 нг/мл и 10 нг/мл, которые в дальнейшем использовали для приготовления калибровочных образцов и образцов контроля качества.

Калибровочные образцы готовили путем смешивания плазмы с соответствующими стандартными растворами розувастатина. Образцы контроля качества готовили в четырех концентрациях: LLOQ (нижний предел количественного определения – 1 нг/мл), LQC (образец контроля качества с низкой концентрацией – 2,5 нг/мл), MQC (образец контроля качества со средней концентрацией – 10 нг/мл), HQC (образец контроля качества с высокой концентрацией – 50 нг/ мл).

Экстракция розувастатина из плазмы крови

Подготовка проб для хроматографического исследования осуществлялась методом жидкость-жидкостной экстракции. Были определены оптимальные условия, позволяющие добиться максимальной степени извлечения с минимальным уровнем фона и достаточной стабильностью получаемых результатов.

В чистую микропробирку типа Eppendorf на 1,5 мл вносили 500 мкл исследуемого образца плазмы, затем к нему добавляли 50 мкл смеси метанола и воды деионизированной (1:1), 200 мкл натрий-фосфатного буферного раствора (pH=5) и затем перемешивали на вихревой мешалке типа Vortex. К полученной смеси добавляли 800 мкл этилацетата, после чего микропробирки встряхивали на шейкере в течение 10 мин. Далее пробы центрифугировали в течение 1 мин со скоростью 13200 об./мин. Верхний органический слой с экстрагированным исследуемым веществом отделяли путем заморозки, помещая пробу в холодильник при температуре -64ºС на 5 мин. Далее пробы анализировались на ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией. Степень извлечения розувастатина из плазмы крови составила, в среднем, 82%.

ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием

Анализ проб с целью определения розувастатина в плазме крови проводился на жидкостном хроматографе Surveyor («Thermo scientific») с тандемным масс-спектрометром. Детектирование проводили в режиме ионизации при атмосферном давлении по основному иону m/z 482,2 и дочернему иону m/z 446. Для хроматографического разделения была использована хроматографическая колонка Zorbax Exlipse XDB-C18 длиной 150×4,6 с размером частиц 5 мкм в градиентном режиме элюирования. В качестве подвижной фазы использовали 0,1% муравьиную кислоту и ацетонитрил.

Количественное определение

Для расчета концентраций розувастатина использовали метод абсолютной калибровки по площади пика. Площади пиков оценивались с помощью программы XCalibur (ver. 2.5.6., «Thermo scientific», США) в режиме автоматического интегрирования.

Для оценки линейности методики осуществлялось построение калибровочного графика: готовили калибровочные модельные смеси путем внесения в интактную плазму крови соответствующих стандартных растворов розувастатина.

Представленные данные свидетельствуют о том, что для определяемого вещества калибровочный график (рис. 1) описывается линейной функцией с высоким показателем достоверности аппроксимации. Коэффициент корреляции составил 0,9985.

Правильность и прецизионность методики соответствовала критериям приемлемости (не более 20% для нижней точки, не более 15% – для остальных).

Статистическая обработка полученных результатов

На основании полученных результатов измерения концентрации розувастатина в плазме крови добровольцев с помощью программы R Statistics 3.0.2 (Package 'bear' 2.6.1) определялись и/или вычислялись следующие фармакокинетические параметры розувастатина: Cmax, Tmax, AUC0-t, AUC0-∞, MRT, Kel, T1/2. Для каждого из вышеперечисленных параметров рассчитывались значения описательной статистики: среднее арифметическое (Mean), среднее геометрическое (Gmean), стандартное отклонение (SD), медиана (Median), коэффициент вариации (CV).

Также рассчитывали параметры относительной биодоступности тестового препарата по сравнению с референтным препаратом (f'_{0-t}, $f'_{0-\infty}$ и f'').

Результаты и их обсуждение

На рис. 2 представлены усредненные фармакокинетические кривые розувастатина в плазме крови добровольцев после однократного приема препаратов ВЛС и РП (20 мг), где анализируемое вещество определялось в течение 72 ч.

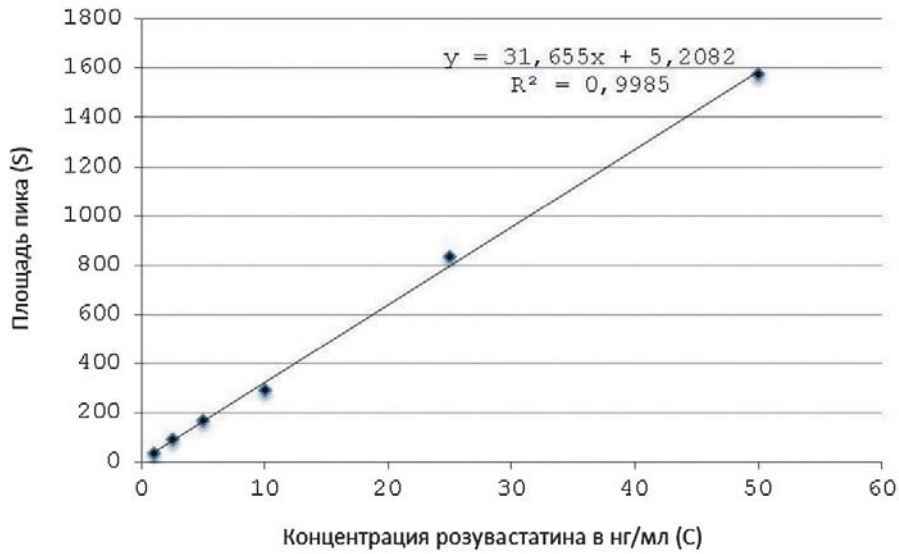

Рис. 1. Калибровочный график зависимости концентрации розувастатина от площади пика.

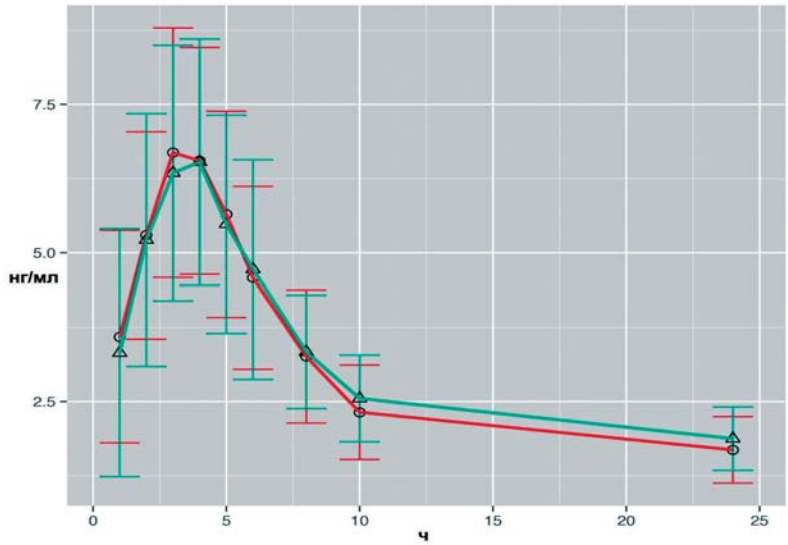

Рис. 2. Средние фармакокинетические кривые розувастатина в плазме крови добровольцев после приема ВЛС (голубая кривая) и РП (розовая кривая). «Усы» – 90% доверительный интервал. N=28.

Анализ усредненных фармакокинетических кривых показал, что после приема как препарата сравнения, так и испытуемого препарата розувастатин достаточно быстро всасывается в системный кровоток из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Характер зависимости «концентрация – время» розувастатина у сравниваемых препаратов практически не отличается друг от друга (рис. 2).

Для индивидуальных значений концентраций розувастатина характерен значительный разброс данных внутри группы, который можно объяснить индивидуальной вариабельностью.

Все фармакокинетические параметры по каждому добровольцу в отношении каждого лекарственного препарата представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Фармакокинетические параметры препаратов ВЛС и РП после однократного приема добровольцами внутрь (20 мг)

Показатель	Параметр								
	T_{max}, ч	C_{max}, нг/мл	MRT, ч	$T_{1/2}$, ч	K_{el}, $ч^{-1}$	$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	AUC_{0-t}, нг·ч/мл	$C_{max}/AUC_{0-\infty}$, $ч^{-1}$	C_{max}/AUC_{0-t}, $ч^{-1}$
ВЛС									
Mean	3,75	7,48	26,41	17,81	0,09	116,71	64,07	0,08	0,13
Gmean	3,56	7,24	19,7	12,2	0,06	101,08	60,24	0,07	0,12
SD	1,21	1,76	19,47	14,33	0,08	62,17	19,42	0,05	0,05
CV	32,15	23,52	73,73	80,49	94,78	53,27	30,31	56,75	36,55
Median	4	7,16	19,96	12,93	0,05	105,13	68,32	0,07	0,11
РП									
Mean	3,64	7,73	26,41	23,1	0,08	124,01	62,94	0,08	0,13
Gmean	3,52	7,55	19,7	14,78	0,05	108,18	60,87	0,07	0,12
SD	0,95	1,60	19,47	22,04	0,1	75,04	16,47	0,04	0,03
CV	26,11	20,75	73,73	95,37	123,66	60,51	26,16	53,27	26,32
Median	3,5	7,77	19,96	14,13	0,05	104,07	59,67	0,07	0,13

Таблица 2

Параметры относительной биодоступности ВЛС по отношению к РП

Показатель	$f'_{0-\infty}$	f'_{0-t}	f''
Mean	1,009	1,050	1,005
Gmean	0,934	0,989	0,959
SD	0,414	0,350	0,321
CV	41,0	33,3	31,9
Median	0,963	1,018	0,972

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 1) розувастатина после однократного приема 20 мг РП и ВЛС показал, что изучаемые препараты почти с одинаковой скоростью всасываются из ЖКТ (параметр C_{max}/AUC_{0-t} для ВЛС составил 0,13±0,05 ч, для РП – 0,13±0,03 ч). Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) составило, в среднем, для ВЛС – 3,75±1,21 ч и для РП – 3,64±0,95 ч. При этом средняя максимальная концентрация розувастатина, определяемая в плазме крови добровольцев (Cmax), составила для ВЛС – 7,48±1,76 нг/мл, а для РП – 7,73±1,60 нг/мл. Среднее время удерживания (MRT) розувастатина в плазме крови после приема ВЛС и РП составило 26,01±19,25 ч и 26,41±19,47 ч соответственно. Период полуэлиминации ($T_{1/}2$) составил 17,81±14,33 ч для препарата ВЛС и 23,1±22,0 – для препарата РП.

Относительная биодоступность ВЛС по отношению к РП (табл. 2), определяемая отношением соответствующих значений $AUC_{o-\infty}$ и AUC_{o-t}, составила, в среднем, 1,009±0,414 и 1,050±0,350 ($f'_{0-\infty}$ и f'_{0-t}) соответственно. Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений Cmax, составила 1,005±0,321.

Из приведенных данных видно, что среднее значение относительной степени всасывания (относительная биодоступность – f') и величина отношения максимальных концентраций после приема исследуемых препаратов не выходят за допустимые пределы [3].

Анализ фармакокинетических данных проводили исходя из предположения о лог-нормальном распределении параметров $AUC_{0-\infty}$, C_{max} и $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ и нормальном распределении остальных параметров, за исключением T_{max}. Статистический анализ различий T_{max} проводился с помощью непараметрического Т-критерия Вилкоксона для парных выборок (нетрансформированные данные, двусторонний тест). Статистический анализ различий параметров MRT, $T_{1/2}$, K_{el} проводился с помощью параметрического двухстороннего t-критерия Стьюдента для парных выборок (нетрансформированные данные).

Применение параметрической и непараметрической статистики показало, что различия сравниваемых препаратов по показателям T_{max}, MRT, K_{el}, $T_{1/2}$ статистически не значимы. Достигнутый уровень значимости $p>0,05$ для T_{max} розувастатина позволяет принять нулевую гипотезу об отсутствии различий между средними значениями T_{max} двух связанных выборок, т.е. по данному показателю различия между ВЛС и РП статистически не значимы. Также отсутствовали статистически значимые различия между средними значениями показателей MRT, $T_{1/2}$, K_{el}. Во всех случаях при проверке нулевой гипотезы достигнутый уровень значимости (p) был больше критического уровня 0,05.

Таким образом, между исследуемыми препаратами ВЛС и РП не выявлено статистически достоверных различий в процессе всасывания – как по полноте, так и по скорости данного процесса.

Результаты дисперсионного анализа логарифмически преобразованных фармакокинетических параметров $AUC_{0-\infty}$, C_{max}, $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ розувастатина после приема ВЛС и РП добровольцами (20 мг однократно) представлены в табл. 3.

Результаты дисперсионного анализа сравниваемых параметров позволили принять нулевую гипотезу о том, что различия в средних значениях основных фармакокинетических параметров не вызваны различиями между исследуемыми препаратами: все факторы, кроме индивидуальной вариабельности, вносят статистически незначительный вклад в общую вариацию фармакокинетических параметров $AUC_{0-\infty}$, C_{max} и $C_{max}/AUC_{0-\infty}$.

Таблица 3

Результаты дисперсионного анализа фармакокинетических параметров розувастатина (логарифмически преобразованные значения). Оценка эффектов межгрупповых факторов

Источник вариации	Число степеней свободы	Сумма квадратов отклонений	Средний квадрат отклонений	F-критерий Фишера	Значимость критерия Фишера
$AUC_{0-\infty}$					
Препарат	1	0,05	0,048	0,58	0,45
Период	1	0,07	0,073	0,88	0,36
Добровольцы	26	12,65	0,486	5,88	$1,2e^{-05}$
Остаточная дисперсия	26	2,15	0,083		
C_{max}					
Препарат	1	0,015	0,0146	0,29	0,60
Период	1	0,027	0,0270	0,53	0,47
Добровольцы	26	2,015	0,0775	1,52	0,15
Остаточная дисперсия	26	1,327	0,0551		
$C_{max}/AUC_{0-\infty}$					
Препарат	1	0,01	0,010	0,10	0,75
Период	1	0,01	0,011	0,12	0,73
Добровольцы	26	14,08	0,542	5,67	$1,7e^{-05}$
Остаточная дисперсия	26	2,49	0,096		

Таблица 4

90% доверительные интервалы для отношений средних значений параметров $AUC_{0-\infty}$, C_{max} и $C_{max}/AUC_{0-\infty}$, %

Параметр	Отношение средних значений	Коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности	90% доверительные интервалы	Критерий биоэквивалентности
$AUC_{0-\infty}$	98,7	29,3	81,5 – 106,0	80-125
C_{max}	97,9	22,8	86,3 – 106,1	75-133
$C_{max}/AUC_{0-\infty}$	99,9	31,6	89,3 – 118,4	75-133

Рассчитанные 90% доверительные интервалы для отношений средних логарифмически преобразованных значений фармакокинетических параметров $AUC_{0-\infty}$, C_{max} и $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ розувастатина, а также коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности этих параметров представлены в табл. 4.

Как видно из представленных данных, средние значения и доверительные интервалы основных фармакокинетических параметров не выходят за допустимые пределы [3].

Заключение

Таким образом, настоящее исследование сравнительной фармакокинетики двух лекарственных средств показало, что препарат ВЛС (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг) и препарат сравнения РП (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг) являются биоэквивалентными.

Список литературы

1. Национальный стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р ИСО 14155 – 2014. Клинические исследования. Надлежащая клиническая практика. – М.: Стандартинворм, 2015, 46 с.
2. ***Недогода С.В.*** Выбор статина для гиполипидемической терапии с позиций клинической фармакологии и доказательной медицины // Кардиоваск. терапия и профилактика. – 2008. – № 7. – С. 112-115.
3. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств: Методические указания. – 2008, 32 с.
4. ***Харченко В.И., Какорина Е.П., Корякин М.В. и др.*** Смертность от болезней системы кровообращения в России и в экономически развитых странах. Необходимость усиления кардиологической службы и модернизации медицинской статистики в Российской Федерации // Рос. кардиол. журнал. – 2005. – № 2. – С. 3-9.
5. ***Boitsov S., Khomitskaya Y.U.V.*** Centralized pan-Russian Survey on the undertreatment of hyhercholesterolemia (CEPHEUS) // Eur. Heart J. – 2012. – Vol. 33 (Abstract Suppl.). – P. 451.
6. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) // Eur. Heart J. – 2011. – Vol. 32 (14). – P. 1769-1818.
7. ***Kasliwal R., Wilton L.V., Cornelius V., et al.*** Safety profile of rosuvastatin: results of a prescription-event monitoring study of 11,680 patients // Drug saf. – 2007. – Vol. 30 (2). – P. 157-170.

8. ***McAfee A.T., Ming E.E., Seeger J.D., et al.*** The comparative safety of rosuvastatin: a retrospective matched cohort study in over 48,000 initiators of statin therapy // Pharmacoepidemiol. drug saf. – 2006. – Vol. 15 (7). – P. 444-453.

9. ***McTaggart F., Buckett L., Davidson R., et al.*** Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin A new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor // Am. J. Cardiol. – 2001. – Vol. 87 (5A). – P. 28B-32B.

The study of comparative pharmacokinetics of preparations containing rosuvastatin

L.M. Krasnykh, V.V. Smirnov, O.A. Goroshko, E.A. Yegorenkov, G.F. Vasilenko, G.V. Ramenskaya, A.E. Petukhov

The study of comparative pharmacokinetics of preparations containing rosuvastatin, 20 mg was carried out. Determination of the rosuvastatin concentration in the blood plasma of volunteers was performed by HPLC with mass spectrometric detection. Conditions for the chromatographic separation, conditions of extraction and quantitative determination of the plasma rosuvastatin levels were selected. For the study preparations to calculate the main pharmacokinetic parameters: $AUC_{0-\infty}$, C_{max}, T_{max}, C_{max}/AUC. 90% confidence interval for the log-transformed values $AUC_{0-\infty}$ was 81,5-106,0 and C_{max} – 86,3-106,1. The study concluded compared bioequivalence of drugs.

Key words: rosuvastatin, pharmacokinetics, bioequivalence.