

На правах рукописи

АНЬКОВ СЕРГЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ТОКСИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
НАНОАЭРОЗОЛЬНОЙ ФОРМЫ ИБУПРОФЕНА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Томск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Толстикова Татьяна Генриховна

Официальные оппоненты:

Шилова Инесса Владимировна, доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», лаборатория фитофармакологии и специального питания, старший научный сотрудник

Жариков Александр Юрьевич, доктор биологических наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, заведующий кафедрой, проректор по инновациям в науке

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « ___ » _____ 2016 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.031.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (634028, г. Томск, пр. Ленина)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (www.pharmso.ru)

Автореферат разослан « _____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Амосова Евдокия Наумовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По данным ВОЗ нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) по массовости применения занимают 2-е место после антибиотиков. Особенностью современных НПВС является многообразие их лекарственных форм для местного и парентерального применения [Laube V.L., Janssens H.M. et al., 2011]. Основными показаниями для назначения НПВС являются воспалительные процессы различного генеза, системные заболевания соединительной ткани, болевые синдромы, что определяет их широкое использование в ревматологии, кардиологии, неврологии и онкологии [Насонов Е.Л., 2003].

Несмотря на высокую клиническую эффективность, существенно лимитируют применение НПВС побочные эффекты, которые встречаются в каждом четвертом случае, а у 5% больных представляют серьезную угрозу для жизни [Насонов Е.Л. и др., 1996]. Основным побочным действием всех НПВС является высокий риск развития таких осложнений как язва желудка, эрозивный гастрит, гепатотоксичность. Альтернативным инвазивному и пероральному путям доставки лекарств является аэрозольная форма [Siekmeier R., Scheuch G., 2008; Laube V.L., Janssens H.M. et al., 2011], которая обладает рядом преимуществ и позволяет минимизировать побочные эффекты НПВС. В частности, респираторное введение НПВС позволяет избежать метаболических потерь в процессе энтерогепатической циркуляции. В отличие от парентерального способа введения, ингаляционная терапия является неинвазивной, не имеет ограничений, связанных с водонерастворимостью лекарственных средств [Benet L.Z., 1978; Hindle M., Chrystyn H., 1994; Farr S.J. et al., 1995; Patton J.S. et al., 2004; Laube V.L. et al., 2011]. В связи с этим чрезвычайно актуальной является разработка безопасных и эффективных форм доставки НПВС.

Степень разработанности. Основными проблемами при проведении ингаляционной терапии являются недостаточная точность дозировки, эффективность и воспроизведение вводимых доз лекарственных препаратов. Известно, что лишь небольшая фракция вдыхаемого препарата достигает альвеолярной области в легких и попадает в системный кровоток [Tian G. et al., 2011]. Это связано с большими размерами аэрозольных частиц, которые не в состоянии достигнуть альвеолярной области легких [Hinds W.C., 1999; Jaques P.A., Kim C.S. 2000; Edwards D.A. et al., 2003]. Другая часть проблемы связана с риском аллергических реакций в респираторном тракте и потенциальной вариабельностью абсорбции активного вещества из альвеол в систему кровообращения [Phalen R.F. et al., 2006]. В исследованиях показано, что на абсорбцию препаратов на уровне альвеол существенное влияние оказывает наличие у пациентов хронической обструктивной болезни легких [Серета В.П., Свистов А.С. и др., 2004]. При изучении системного эффекта ингаляционных высокомолекулярных соединений: инсулина, гепарина, интерлейкина-2 было установлено, что введение препаратов в форме аэрозоля с контролируемыми параметрами может служить неинвазивной альтернативой инъекционному введению лекарств [Siekmeier R., Scheuch G., 2008].

В настоящее время активно ведутся работы по созданию наноаэрозольных форм препаратов, существенным преимуществом которых является сочетание низких доз с высокой специфической активностью [Rabinowitz J.D. et al., 2004]. В ходе многочисленных экспериментов были впервые созданы наноаэрозольные формы индометацина и ибупрофена [Онищук А.А. и др., 2009]. Впервые был выявлен противовоспалительный эффект для на-

ночастиц индометацина, а для наночастиц ибупрофена – анальгетический [Онищук А.А. и др., 2009]. Также нами было подтверждено отсутствие повреждающего действия на ткань легкого [Onischuk A.A., Tolstikova T.G., 2008; Onischuk A.A., Tolstikova T.G. et al., 2009; Tolstikova T.G., Onischuk A.A. et al., 2012]. Следует отметить, что эффективные вводимые дозы препаратов были снижены в миллионы раз в сравнении с их традиционной формой доставки. Таким образом, дальнейшее изучение наноаэрозольных форм НПВС является чрезвычайно актуальным. Данная лекарственная форма может быть рекомендована для купирования болевых синдромов и воспаления в различных областях медицины.

Цель исследования: изучить фармакологические свойства наноаэрозольных форм ряда нестероидных противовоспалительных средств и фармакокинетические параметры ибупрофена с оценкой его влияния на структуру ткани лёгких.

Задачи исследования:

1. Провести скрининг противовоспалительной и анальгетической активности наноаэрозольных форм диклофенака натрия, индометацина, бутадiona и ибупрофена.
2. Установить для наноаэрозольных форм НПВС терапевтически эффективные и безопасные диапазоны доз и размер частиц.
3. Оценить токсико-фармакологические свойства наноаэрозольной формы ибупрофена как наиболее перспективного с точки зрения эффективности и фармакоэкономической значимости препарата:
 - определить фармакокинетические параметры наноаэрозольной формы ибупрофена;
 - изучить влияние наноаэрозольной формы ибупрофена на морфологию легочной ткани.

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые был проведен скрининг фармакологических свойств наноаэрозольных форм (размер частиц менее 100 нм) таких нестероидных противовоспалительных средств, как диклофенак натрия, индометацин, бутадion и ибупрофен. Впервые установлены для наноаэрозольной формы НПВС терапевтически эффективные и безопасные диапазоны доз и размеры частиц, позволившие повысить их базовую активность в несколько порядков (3-9). Установлено, что данная лекарственная форма позволила снизить эффективную дозу НПВС от $3,3 \cdot 10^4$ до $1,9 \cdot 10^9$ раз по сравнению с их традиционной пероральной формой доставки.

Впервые на примере наноаэрозольной формы ибупрофена было проведено определение фармакокинетических параметров и сделана морфологическая оценка влияния наночастиц на структуру легких.

На основании проведенных фармакокинетических исследований впервые установлено, что высокая активность ибупрофена в наноаэрозольной форме связана с двукратным увеличением скорости достижения максимальной концентрации в крови и показателя площади под кривой (концентрация / время) по сравнению с пероральной и внутривенной формами доставки.

Установлено, что максимальная концентрация ибупрофена в крови достигается после однократной 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля и сохраняется в крови в течение суток.

Впервые установлена рациональная кратность приема наноаэрозольной формы ибупрофена в эффективной дозе, которая составляет один раз в сутки. Впервые показано,

что после воздействия наноаэрозольной формы ибупрофена все структурные изменения тканей легких имеют обратимый характер.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенные исследования являются инновационными в плане изучения токсико-фармакологических свойств наноаэрозольной формы (до 100 нм) НПВС – диклофенака натрия, индометацина, бутадио-на и ибупрофена. Полученные данные позволят лучше понять стабильность высокой активности наноаэрозольных форм изученных НПВС при существенном снижении дозы от $3,3 \cdot 10^4$ до $1,9 \cdot 10^9$ раз по сравнению с их традиционной формой доставки.

В работе показано, что эффективность ибупрофена в виде сухого наноаэрозоля остается высокой за счёт двукратного увеличения скорости достижения максимальной концентрации в крови и увеличения показателя площади под кривой (концентрация/время) по сравнению с другими формами доставки, при отсутствии необратимых структурных изменений тканей легких.

Наноаэрозольная форма ибупрофена рекомендована для дальнейших доклинических исследований в качестве перспективной малотоксичной и быстродействующей лекарственной формы. Предлагаемый технологический подход в дальнейшем позволит создавать наноаэрозольные формы других фармакологических групп препаратов с целью снижения терапевтической дозы, и, как следствие, их токсических побочных эффектов, а также расширить область применения.

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам выбраны современные высокоинформативные методологические подходы. Диссертационная работа представляет собой экспериментальное исследование, выполненное на 450 животных. Основные эксперименты выполнены согласно методическим рекомендациям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., Бутанян Н.Д., 2012]. В ходе работы использовали тесты для определения анальгетической активности на моделях висцеральной и тактильной боли, противовоспалительную активность изучали на моделях гистаминового и формалинового отека. Фармакокинетические параметры изучали методом ВЭЖХ с последующей статистической обработкой данных. Для изучения токсического действия проводили морфологическое исследование легких.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов, соответствующих поставленным задачам. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Основные результаты работы представлены на международных практических конференциях: «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 2013); «Drug Absorbtion, Transport and Delivery (WCDATD): Responding to Challenging Situations» (Uppsala-Sweden, 2013); «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2013); «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Москва, 2013); «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Крым, Гурзуф, 2015).

Публикации. По теме диссертации было опубликовано 3 работы в журналах, рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 111 страницах компьютерного текста и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы; иллюстрирована 14 таблицами, 33 рисунками. Список использованной литературы включает 51 работы отечественных и 141 работы иностранных авторов.

Работа выполнена в лаборатории фармакологических исследований Отдела медицинской химии Новосибирского института органической химии им Н.Н. Ворожцова СО РАН (зав. лаб. - д.б.н., проф. Т.Г. Толстикова) при финансовой поддержке программы междисциплинарный интеграционный проект СО РАН №108 «Нетрадиционные способы введения веществ в организм и физические методы модифицирования их свойств».

Автор искренне благодарит сотрудников лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН за помощь в выполнении экспериментальной части работы. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.б.н., проф. Т.Г. Толстиковой за ценные указания в ходе экспериментальной работы и помощь при написании диссертационной работы. Также автор благодарит д.м.н. Н.А. Жукову за помощь в выполнении гистологических исследований и интерпретации полученных результатов и помощь при написании диссертационной работы. Автор искренне признателен коллективу лаборатории наночастиц ИХК и Г СО РАН д.х.н., проф. А.А. Онищуку, к.х.н. А.М. Бакланову и к.х.н Г.Г. Дульцевой за помощь в проведении экспериментальных работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическое и практическое значение работы.

В первой главе проведен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования. В первом разделе представлены сведения о механизме действия и техническом обеспечении аэрозольных лекарственных форм. С привлечением большого количества литературных источников дано представление о воспалении, описаны механизмы действия НПВС и их основные эффекты.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования.

Экспериментальные исследования проводили на 300 аутбредных мышках-самцах CD-1 массой 20-30г, и 150 крысах-самцах сток Вистар массой 200-250 г, первой категории конвенциональные. Животные были получены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН, содержались в стандартных условиях при неограниченном доступе к воде и гранулированному корму.

Работы с животными проводили в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации Приказу МЗ РФ № 708 Н от 28 августа 2010 г., ГОСТ Р 53434 – 2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Все исследуемые вещества: диклофенак фирмы «Acros», индометацин фирмы «Sigma», бутадиион фирмы «Sigma», ибупрофен фирмы «Acros» вводили в виде сухого

наноаэрозоля, полученного в установке, разработанной на базе Института химической кинетики и горения СО РАН в лаборатории наночастиц (зав. лаб. проф. Онищук А.А.). Дозы референс препаратов ибупрофена – 80 мг/кг, индометацина – 15, 20 мг/кг, диклофенака натрия – 10 мг/кг, бутадиона - 50 мг/кг были определены экспериментальным путем и вводились per os.

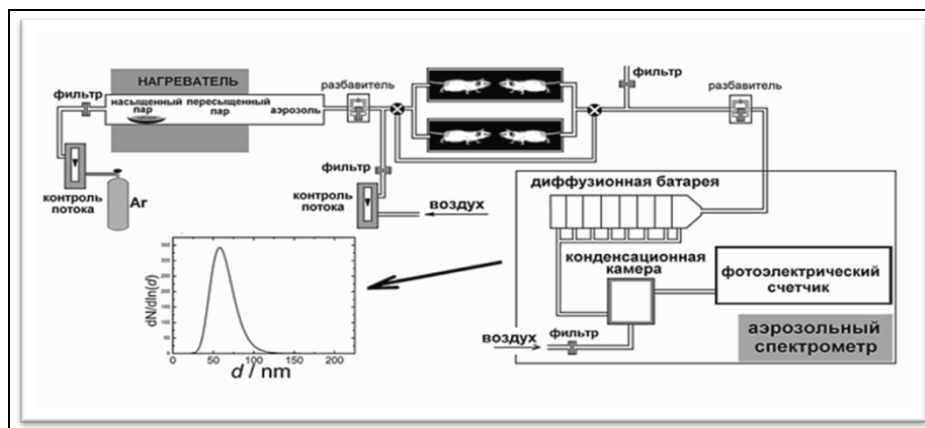


Рис. 1. Общая схема экспериментальной установки для проведения ингаляционных экспериментов с лабораторными животными.

Данная установка позволяет генерировать сухие частицы размером 10-100 нм путем гетерогенной нуклеации, и с помощью диффузионного спектрометра аэрозоля (ДСА) вести измерение концентрации и размера частиц в режиме реального времени. В наноаэрозольной установке использовали 2 типа камер: «Whole body» (WB) для мышей и «Nose only» (NO) для крыс. Расчет дозы наноаэрозоля производился по формуле:

$$Dose = \frac{V_E}{60} n_{av} \varepsilon(d) mt = \frac{V_E}{60} n_{av} \left[0.19 + (0.83 - 0.19) / (1 + \exp\left(\frac{d(nm) - 12.0}{24.0}\right)) \right] mt$$

где V_E - минутный объем, т.е. количество воздуха проходящего через легкие за одну минуту; n_{av} - средняя аэрозольная концентрация в камере; ε - эффективность осаждения в легких (получена экспериментально); m - средняя масса частиц; t - время экспозиции; d - размер частиц.

Все исследуемые соединения вводили в виде наноаэрозоля, длительностью экспозиции 20 минут. Для определения базовой фармакологической активности использовали камеру «WB», для фармакокинетических и токсикологических параметров - применяли камеры «NO». Оценку фармакологического действия проводили согласно методическим указаниям по изучению обезболивающего и противовоспалительного действия фармакологических веществ [Миронов А.Н., Бутанян Н.Д., 2012].

Исследование анальгетической активности проводили на модели химического болевого раздражения тест «уксусные корчи» (УК - уксусная к-та в/б 0,75% 0,1 мл/10 г массы мыши) и термического - «горячая пластина» (ГП, $T = 54^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$). Анальгетическая активность в тесте «УК» представлена в виде процента угнетения болевой реакции - %УБР, по формуле: $\%УБР = 100\% \cdot (K_{\text{контроль}} - K_{\text{опыт}}) / K_{\text{контроль}}$, где: K - среднее количество корчей в группе. Анальгетическую активность в тесте «ГП» представляли в виде процента угнетения болевой реакции - %УБР, по формуле: $\%УБР = 100\% \cdot (T_{\text{контроль}} - T_{\text{опыт}}) / T_{\text{контроль}}$; где T - латентное время болевой реакции. Для сравнения вводили тот же препарат перорально.

Противовоспалительную активность изучали на моделях «гистаминового» и «формалинового» воспаления. Растворы гистамина (0,1%) и формалина (3%) по 0,05 мл вводили в апоневроз задней лапы животного [Morozova E.A. et al., 2008]. Тестируемые соединения вводили в виде нанозероля через 1 час после флоггена. Через 5 часов после воспроизведения воспаления мышей забивали, отрезали лапы и взвешивали. Процент воспаления рассчитывали по формуле: $100\% \cdot (M_{\text{лв}} - M_{\text{лб/в}}) / M_{\text{лб/в}}$; где $M_{\text{лв}}$ – масса лапы с воспалением; $M_{\text{лб/в}}$ – масса лапы без воспаления. Для сравнения тот же препарат вводили в традиционной форме.

Изучение фармакокинетических параметров нанозеролевой формы ибупрофена проводили на крысах в камере «NO» с нанозеролем ибупрофена в дозе $2,4 \cdot 10^{-3}$ мг/кг. Одновременно измеряли фармакокинетические параметры для пероральной и внутрибрюшинной форм доставки ибупрофена. Время забора крови при различных способах введения представлено в таблице 1.

Таблица 1. Время забора крови

Способ введения	время забора крови
нанозеролевый	5, 7, 10, 15, 20, 40, 60 и 120 минут
пероральный	10, 20, 40, 60 и 90 минут
внутрибрюшинный	20, 40, 60 и 90 минут

Кровь центрифугировали в течение 15-ти минут на 3000 об/мин., отбирали сыворотку в количестве не менее 1 мл. Концентрацию ибупрофена в сыворотке крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на микроколоночном жидкостном хроматографе "Милихром А-02" (производства ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", Новосибирск, 2011 г.). Фармакокинетические параметры рассчитывали по средним значениям с помощью программы PKSolver методом Extravascular.

Изучение влияния нанозеролевой формы ибупрофена на функциональную активность легких проводили на крысах Вистар в камере с нанозеролем ибупрофена ($2,4 \cdot 10^{-3}$ мг/кг) с 60 минутной экспозицией до и 20-ти минутной экспозицией после восстановительных периодов различной продолжительности (табл. 2).

Таблица 2. Подробная схема эксперимента

Группы животных (по 8 особей)	I	II	III	IV	V	VI	VII
Длительность первой экспозиции нанозероля ибупрофена	60 минут						
Восстановительный период (часы)	1	2	3	4	5	23	27
Длительность второй экспозиции нанозероля ибупрофена	20 минут						
Затем животных выводили из эксперимента, забирали кровь, для определения значений средних концентраций ибупрофена в сыворотке крови.							

Токсическое влияние нанозеролевой формы ибупрофена в дозе $2,4 \cdot 10^{-3}$ мг/кг на легкие изучали на крысах Вистар. Животных подвергали воздействию нанозероля ибупрофена различной продолжительностью, кратностью и длительностью восстановительного периода. Сравнением являлась группа контрольных животных, не подвергавшихся воздействию нанозероля. Схема эксперимента представлена в таблице 3.

Таблица 3. Подробная схема эксперимента.

группы (по 6 особей)	время (мин.) и кратность экспозиции	восстановительный период
I	20 минут однократно	-
II	20 минут однократно	20 минут
III	20 минут однократно	40 минут
IV	20 минут однократно	24 часа
V	20 минут трехкратно ч/з 24часа	-
VI	20 минут трехкратно ч/з 24часа	48
VII	20 минут пятикратно ч/з 24часа	-
VIII	20 минут пятикратно ч/з 24часа	48

После восстановительного периода, животных умерщвляли декапитацией, проводили забор легких, которые фиксировали в формалине и подвергали стандартной обработке на гистологическом комплексе «MIKROM» (Карл Цейс). Парафиновые срезы толщиной 3-4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, исследовали методом световой микроскопии в проходящем свете на микроскопе «Axioskop 40» (Карл Цейс).

Статистическая обработка данных проведена с помощью программы «Statistica 7.0», результаты представлены как среднее (M) ± стандартная ошибка среднего (SE). Достоверность определяли по t-критерию Стьюдента. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Третья глава диссертации посвящена описанию и обсуждению результатов скрининга противовоспалительной и анальгетической активности наноаэрозольной формы НПВС. Подробно представлены результаты противовоспалительной активности на модели гистаминового воспаления, анальгетической активности на модели висцеральной боли при наноаэрозольном способе введения в сравнении с пероральным. Описаны фармакокинетические параметры наноаэрозольной формы ибупрофена в сравнении с пероральным и внутривенным способами введения, полученные экспериментальным путем. Воздействие наноаэрозоля ибупрофена на ткань легких подробно изучено в гистологическом исследовании, результаты которого иллюстрированы микрофотографиями с их описанием и оценкой морфологических изменений.

Скрининг противовоспалительной и анальгетической активности нестероидных противовоспалительных средств в наноаэрозольной форме. Была проведена серия экспериментов на аутбредных мышах-самцах CD-1 при моделировании «гистаминового» и «формалинового» воспаления. Животные в группе интактного контроля не подвергались никаким воздействиям, в их поведенческих реакциях не отмечалось каких-либо отклонений. Было сформировано 2 группы референс - контроля: животные находились в аэрозольной камере с током чистого воздуха в течение 20-ти минут и в обычных условиях вне камеры. Для животных получавших НПВС в виде наноаэрозоля группой сравнения являлись животные, находящиеся в камере с током чистого воздуха. Для животных получавших НПВС перорально группой сравнения служили животные, находящиеся вне аэрозольной камеры

По результатам скрининга только на модели «гистаминового» воспаления выявлен противовоспалительный эффект у животных, получавших ибупрофен, индометацин и диклофенак натрия в наноаэрозольной форме в дозах $2,4 \cdot 10^{-3}$, $7,6 \cdot 10^{-9}$, $8,3 \cdot 10^{-7}$ мг/кг соответственно.

Анальгетическая активность на моделях висцеральной (УК) и тактильной (ГП) боли выявлена только у наноаэрозольной формы диклофенака натрия в дозах $2,1 \cdot 10^{-6}$ и $6,4 \cdot 10^{-5}$ мг/кг. Ибупрофен, индометацин, бутадиион в наноаэрозольной форме проявили анальгетическую активность в дозах $2,4 \cdot 10^{-3}$, $4,4 \cdot 10^{-4}$, $1,2 \cdot 10^{-7}$, $3,8 \cdot 10^{-5}$ мг/кг только на модели УК.

Во время экспозиции наноаэрозольной формы ибупрофена в дозе $2,4 \cdot 10^{-3}$ мг/кг у животных наблюдался умеренно выраженный седативный эффект, в виде снижения двигательной активности. Возможно, это связано с проникновением препарата через гематоэнцефалический барьер, где происходит связывание гистамина и не прямое блокирование гистаминовых рецепторов ЦНС по типу действия антигистаминных препаратов I поколения [Котова О.В., 2012].

Применение наноаэрозоля ибупрофена в дозе $2,4 \cdot 10^{-3}$ мг/кг выявило наличие у животных противовоспалительной и анальгетической активности. Реализация данных эффектов связана как с прямым ингибированием ЦОГ, так и со способностью изомеров ибупрофена усиливать синтез эндогенных каннабиноидов, и таким образом влиять на обработку сигналов в головном мозге [Марушко Ю.В. и др., 2013]. Анатомическими и электрофизиологическими исследованиями показано, что не существует единственного центра боли в ЦНС. Восходящие пути проведения ноцицептивной информации проецируются в ретикулярную формацию, гипоталамус, миндалину, отдельные области коры головного мозга, а в генерации болевого импульса принимают участие такие эндогенные вещества, как гистамин, серотонин, простагландины, а также нейропептиды (брадикинин, субстанция Р), цитокины, несколько десятков химических медиаторов [Балашов А.М., Шахбазян И.Е., 2005].

Таким образом, в ходе скрининга впервые у наноаэрозольных форм индометацина, ибупрофена и диклофенака натрия было выявлено наличие противовоспалительной и анальгетической активности, а для бутадииона - только анальгетической активности.

Противовоспалительный эффект нестероидных противовоспалительных средств на модели «гистаминового воспаления» при разных способах введения.

Диклофенак натрия является «золотым стандартом» эффективности, с которым сравнивают новые лекарственные средства [Насонова В.А., 2001]. В серии экспериментов на модели «гистаминового» воспаления выраженный противовоспалительный эффект выявлен у животных, получавших наноаэрозоль диклофенака натрия. Снижение индекса отека в данной группе составило 48%, тогда как при пероральном введении - только 19,4% (табл. 4). Противовоспалительный эффект диклофенака натрия связан с неселективным ингибированием циклооксигеназы, и как следствие снижением образования провоспалительных простагландинов и цитокинов из арахидоновой кислоты [Насонова В.А., 2001].

Таблица 4. Противовоспалительный эффект диклофенака натрия

Группы (по 8 особей)	индекс отека	% эффективности относительно контроля
Контроль (вне камеры)	$27,3 \pm 1,4^*$	0
Диклофенак натрия 10 мг/кг per os	$22,0 \pm 1,6^*$	19,4
Контроль (в аэрозольной камере)	$19,0 \pm 1,9$	0
Н/А диклофенака натрия $8,3 \cdot 10^{-4}$ мг/кг	$9,9 \pm 1,2^{***}$	48

* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ достоверно по сравнению с контролем.

Ибупрофен. На модели «гистаминового воспаления» у ибупрофена в пероральной и наноаэрозольной форме не выявлено существенных различий в степени снижения индекса отека, что составляет 56% и 54% соответственно (табл. 5). Известно, что ибупрофен оказывает положительное воздействие на различные ткани организма при остром воспалении. В связи с восстановлением сниженной активности полисегментоядерных лейкоцитов повышается их фагоцитарная активность, что является благоприятным фактором при лечении острых респираторных заболеваний, сопровождающихся лихорадкой [Skubitz K.M., Hammerschmidt D.E., 1986]. В клинических испытаниях выявлено положительное действие ибупрофена при воспалительных процессах в легких, травмах ЦНС, при инфаркте миокарда [Марушко Ю.В. и др., 2013; Rockwell W.B., Ehrlich H.P., 1990].

Таблица 5. Противовоспалительный эффект ибупрофена

Группа (по 8 особей)	Индекс отека	% эффективности относительно контроля
Контроль (вне камеры)	39,87±2,62	0
Ибупрофен 80 мг/кг (per os).	17,45±1,2*	56
Контроль (в камере)	17,9±1,2	0
Н/А ибупрофена: $2,4 \cdot 10^{-3}$ мг/кг.	8,2±1,2*	54,2

* $p < 0,05$ достоверно по сравнению с контролем.

Индометацин. В данной серии экспериментов наиболее выраженный противовоспалительный эффект выявлен у индометацина в наноаэрозольной форме (табл. 6).

Таблица 6. Противовоспалительный эффект индометацина

Группа (по 8 особей)	Индекс отека	% эффективности относительно контроля
Контроль (вне камеры)	27,8±1,9	0
Индометацин 15 мг/кг per os	23,0±1,8	18
Контроль (в камере)	27,9±1,2	0
Н/А индометацина: $7,6 \cdot 10^{-9}$ мг/кг.	7,4±0,8***	73,5

*** $p < 0,0001$ достоверно по сравнению с контролем.

Индометацин в виде наноаэрозоля уменьшил отек на 73,5%, тогда как в пероральной форме отмечено снижение индекса отека лишь на 18% относительно контроля. Таким образом, наблюдается снижение эффективной противовоспалительной дозы диклофенака натрия в $1,2 \cdot 10^4$, ибупрофена – $3,3 \cdot 10^4$, индометацина - $2 \cdot 10^9$ раз, в сравнении с их эффективной дозой в традиционной форме доставки. Наиболее выраженным противовоспалительным действием в ряду НПВС в наноаэрозольной форме обладает индометацин.

Анальгетический эффект нестероидных противовоспалительных средств на модели «уксусные корчи» при разных способах введения.

Диклофенак натрия. На модели висцеральной боли «УК» в группе животных, получавших наноаэрозоль диклофенака натрия в дозе $2,1 \cdot 10^{-6}$ мг/кг, анальгетический эффект сопоставим с пероральной формой доставки, что в среднем составило 60% (табл. 7). Наноаэрозоль диклофенака натрия в дозе $1,2 \cdot 10^{-6}$ мг/кг в 3 раза менее эффективен, по сравнению с его пероральной и наноаэрозольной формой в дозе $2,1 \cdot 10^{-6}$ мг/кг, что свидетельствует о связи фармаколо-

гической активности с прямым дозозависимым эффектом (табл. 7). Анальгетическая активность диклофенака натрия связана со способностью НПВС действовать на рецепторы НМДА (N -метил-D-аспартатные рецепторы).

Таблица 7. Анальгетический эффект диклофенака натрия

Группы (по 8 особей)	Количество корчей	% УБР
Контроль (без камеры)	11,5±1,9	0
Диклофенак натрия, 10мг/кг per os.	4,6±1,1*	60
Н/А диклофенака натрия, $2,1 \cdot 10^{-6}$ мг/кг.	4,7±1,6*	59
Н/А диклофенака натрия, $1,2 \cdot 10^{-6}$ мг/кг.	8,9±1,6	23

* $p < 0.05$ достоверно относительно контроля.

При подкожном введении диклофенак обнаруживается в различных отделах ЦНС и приводит к увеличению концентрации кинуреиновой кислоты в среднем мозге и люмбосакральных отделах спинного мозга. Кинуреиновая кислота является эндогенным антагонистом глицина - облигатного позитивного модулятора НМДА-рецепторов. Следовательно, диклофенак опосредовано приводит к уменьшению активности системы возбуждающих аминокислот, с чем возможно связан центральный механизм обезболивающего действия НПВС [Edwards S.R. et al., 2000].

Таким образом, эффективная доза наноаэрозольной формы диклофенака натрия была снижена в $1,2 \cdot 10^4$ раз для противовоспалительного эффекта, и в $4,8 \cdot 10^6$ раза для анальгетического. Следует отметить, что диклофенак натрия в форме пероральной суспензии оказался в 2 раза менее эффективным в сравнении с его наноаэрозольной формой. Значительное уменьшение эффективной дозы диклофенака натрия в форме наноаэрозоля может приводить к снижению побочных реакций препарата. Это позволит сократить перечень противопоказаний при его назначении [Henry D., Lim L., et al., 1996; Masso Gonzalez E., Patrignani P., et al., 2010; Vonkeman H.E., van de Laar M.A., 2010; Brun J.; Jones R., 2001; Langman M.J. et al., 1994; Vonkeman H.E. et al., 2007].

Индометацин у животных при пероральном способе введения снижал болевую чувствительность в сравнении с контролем на 27%, а в виде наноаэрозольной формы снижал болевую чувствительность в 2,5 раза эффективнее, чем при пероральном способе введения (табл. 8).

Таблица 8. Анальгетический эффект наноаэрозоля индометацина

Группа (8 особей)	Количество корчей.	% УБР
Контроль (вне камеры)	10,6±1,7	0
Индометацин 20 мг/кг per os	7,8±1,6	27
Индометацин, Н/А $4,4 \cdot 10^{-4}$ мг/кг.	3,4±0,9*	68

* $p < 0.05$ достоверно относительно контроля.

Индометацин имеет общие со всеми НПВС побочные эффекты: ulcerогенное действие, бронхоспазм, влияние на свертываемость крови. [Gillman A.G., et al., 1985]. Эффективную дозу индометацина для противовоспалительного эффекта снизили в $1,9 \cdot 10^9$ раз в сравнении с традиционной формой доставки, а для анальгетического эффекта - в $4,5 \cdot 10^4$ раз, с существенным увеличением анальгетического действия.

Бутадиион в ряду НПВС по своей активности сопоставим с диклофенаком натрия [Бертрам Г. Катцунг, 1998], и при наноаэрозольном способе доставки было установлено от-

личие эффективности препарата в зависимости от способа введения: бутадион в виде наноаэрозоля не проявляет противовоспалительной активности. На модели «УК» у наноаэрозольной формы бутадиона выявлена аналгетическая активность в дозе $3,8 \cdot 10^{-5}$ мг/кг и $1,2 \cdot 10^{-7}$ мг/кг, что сопоставимо с таковым при пероральном способе доставки (табл. 9).

В данной серии экспериментов у наноаэрозольной формы бутадиона была выявлена только аналгетическая активность на модели висцеральной боли, в дозе сниженной в $4,2 \cdot 10^8$ раз по сравнению с традиционной пероральной формой доставки препарата. Таким образом, наноаэрозольная форма бутадиона позволила повысить эффективность препарата в миллионы раз. Известно, что плейотропными свойствами бутадиона являются, как общие побочные для всех неселективных ингибиторов ЦОГ эффекты, так и характерные именно для него: агранулоцитоз и апластическая анемия [Бертрам Г. Катцунг, 1998].

Таблица 9. Анальгетический эффект бутадиона

Группа (8 особей)	Количество корчей	% УБР
Контроль (вне камеры)	14,2±1,2	0
Бутадион, 50 мг/кг per os	7,6±1,3*	47
Бутадион Н/А, $3,8 \cdot 10^{-5}$ мг/кг.	6,0±1,4*	58
Бутадион Н/А $1,2 \cdot 10^{-7}$ мг/кг.	5,7±2,1*	60

* $p < 0,05$ достоверно относительно контроля;

Такое существенное снижение дозы, позволяет предполагать, что прием бутадиона в виде наноаэрозоля поможет избежать побочных эффектов при длительном приеме препарата [Angst, M.S. et al., 2008; Angst, M.S., Tingle, M. et al., 2008].

Ибупрофен. Анальгетический эффект ибупрофена в наноаэрозольной форме, наиболее выражен по сравнению с наноаэрозолями диклофенака, индометацина, бутадиона. Снижение болевой чувствительности составило 93% относительно контрольной группы (табл. 10). Доза ибупрофена в виде наноаэрозоля снижена по сравнению с традиционной формой доставки в $3,3 \cdot 10^4$ раз. При этом, ибупрофен оказывает как противовоспалительное действие, так и аналгетическое.

Таблица 10. Анальгетический эффект ибупрофена

Группы (8 особей)	Количество корчей	% УБР
Контроль	4,0±1,28	0
Ибупрофен, 80 мг/кг per os	3,25±1,8	19
Ибупрофен Н/А, $2,4 \cdot 10^{-3}$ мг/кг.	0,29±0,18*	93

* $p < 0,05$ достоверно относительно контроля.

Нами установлено, что повышение концентрации наноаэрозоля ибупрофена при увеличении размера частиц сопровождается снижением эффективности. Это связано с тем, что частицы размером более 100 нм не достигают альвеолярной области, оседая преимущественно в верхних отделах дыхательных путей [Morrow P.E., 1966; Brain J.D., Valberg P.A., 1979]. Существенное снижение дозы препарата позволит уменьшить ulcerогенное побочное действие, бронхоспазм, нарушение свертываемости крови [Champion G.D, Feng P.H. et al., 1997; Lesco S.M., 1999; Насонов Е.Л., 2002; Hillis W.S., 2002; Геппе Н.А., 2002].

Таким образом, наноаэрозоли диклофенака натрия, индометацина, бутадиона, ибупрофена проявляют анальгетическую активность на модели висцеральной боли, тогда как на модели тактильной боли эти препараты оказались неэффективными независимо от способа введения. На основании полученных экспериментальных данных наноаэрозольная форма доставки НПВС, оценивается как перспективная для дальнейшего изучения.

По результатам скрининга для определения фармакокинетических, токсических и функциональных параметров был выбран ибупрофен. Этот выбор объясняется тем, что наноаэрозольная форма ибупрофена обладает анальгетической и противовоспалительной активностью в одинаковом диапазоне размеров частиц, при этом установлена связь эффективности действия с их размером.

Фармакокинетические параметры ибупрофена

Фармакокинетические параметры при внутрибрюшинном введении ибупрофена. Для установления длительности терапевтического действия наноаэрозольной формы ибупрофена были проведены фармакокинетические исследования, целью которых, являлось установление безопасности его применения с оценкой токсико-фармакологических и функциональных параметров. Для препарата ибупрофен существуют лекарственные формы для энтерального и ректального способов введения. Важными преимуществами ибупрофена в сравнении с другими НПВС являются меньшая кратность приема, широкое терапевтическое окно, отсутствие образования активных метаболитов. Разнообразие лекарственных форм ибупрофена обеспечивает дополнительные преимущества применения препарата в соответствии с клинической ситуацией. Для данного исследования внутрибрюшинное введение было выбрано как наиболее близкое по фармакокинетике к ректальному способу введения [Марушко Ю.В. и др., 2013]. Водно-твиновый раствор ибупрофена вводили крысам внутрибрюшинно в дозе $2,4 \cdot 10^{-3}$ мг/кг, затем через разные промежутки времени после введения забирали кровь, и определяли концентрацию ибупрофена. С помощью специальной программы проводили расчёт фармакокинетических параметров, представленных в таблице 11 и на рисунке 2.

Таблица 11. Фармакокинетические параметры внутрибрюшинного введения ибупрофена.

Параметр	Единица измерения	Значение
Lambda_z	1/min	0,025
t1/2	min	28,04
Tmax	min	40
Cmax	µg/ml	0,108
Tlag	min	0
Clast_obs/Cmax		0,29
AUC 0-t	µg/ml*min	6,3
AUC 0-inf_obs	µg/ml*min	7,5
AUC 0-t/0-inf_obs		0,83
AUMC 0-inf_obs	µg/ml*min ²	418,87
MRT 0-inf_obs	min	55,54
Vz/F_obs	(µg)/(µg/ml)	0,0132

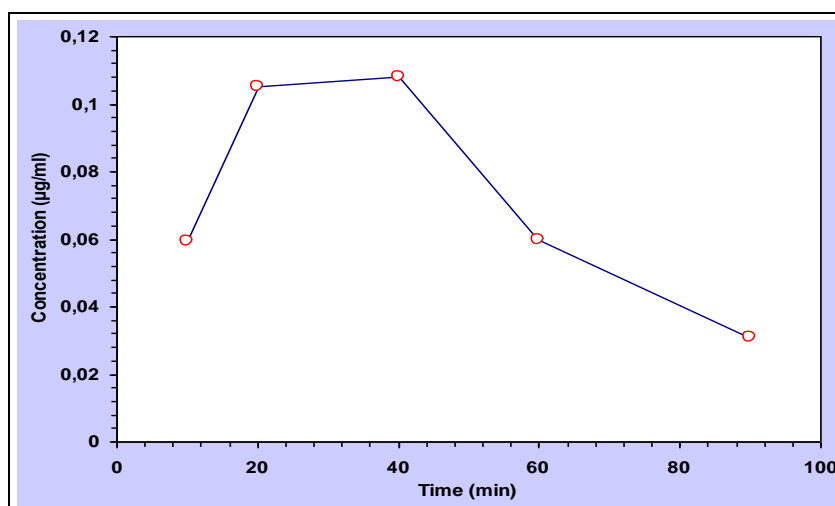


Рис. 2. Фармакокинетическая кривая зависимости концентрации от времени при внутривенном способе введения суспензии ибупрофена.

Было установлено, что время достижения максимальной концентрации в крови ибупрофена составляет 40 минут, время нахождения препарата в максимальной концентрации в крови (AUC) составляет 418,87 мкг/мл в минуту, а среднее время удерживания (MRT) - 55,54 минут

Фармакокинетические параметры при пероральном введении ибупрофена определяли для сравнительного анализа с традиционным способом введения. Время достижения максимальной концентрации и вид фармакокинетической кривой (концентрация/время) в целом совпали с литературными данными и составили T_{max} - 40 минут, AUC - 762,3 мкг/мл в минуту и MRT - 71,15 минут (табл. 12, рис. 3).

Таблица 12. Фармакокинетические параметры перорального введения ибупрофена.

Параметры	Единица измерения	Значение
Lambda_z	1/min	0,023
t1/2	min	30,6
Tmax	min	40
Cmax	µg/ml	0,16
Tlag	min	0
Clast_obs/Cmax		0,34
AUC 0-t	µg/ml*min	8,3
AUC 0-inf_obs	µg/ml*min	10,71
AUC 0-t/0-inf_obs		0,77
AUMC 0-inf_obs	µg/ml*min ²	762,3
MRT 0-inf_obs	min	71,15
Vz/F_obs	(µg)/(µg/ml)	329,56

При сравнении данных перорального и внутривенного способов введения, установлено, что близкими по значению были такие фармакокинетические параметры, как время достижения максимального эффекта T_{max} - 40 минут и C_{max} - 0,11 мкг/мл для внутривенного и 0,16 мкг/мл для перорального введения.

Таким образом, на основании проведенных исследований показано, что основные фармакокинетические параметры для перорального способа введения полностью совпали с

литературными данными [Mutschler E. et al., 1995]. Это говорит о точности методов определения параметров в наших экспериментах.

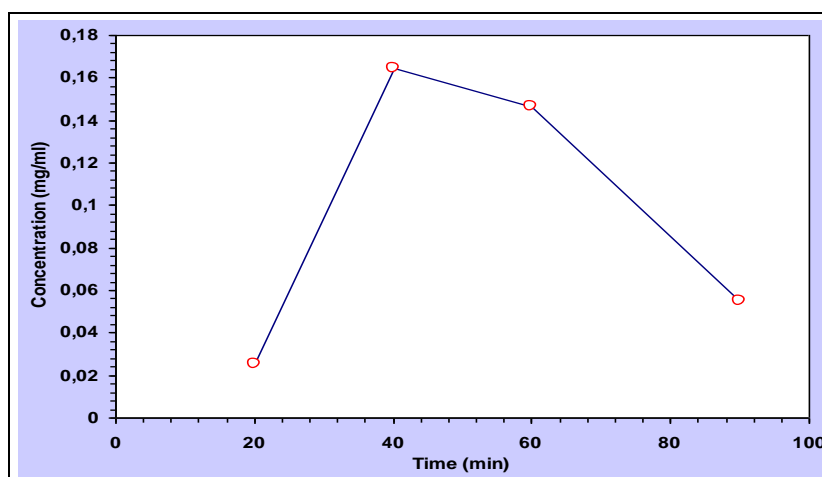


Рис. 3. Фармакокинетическая кривая зависимости концентрации от времени при пероральном введении суспензии ибупрофена.

Определив фармакокинетические параметры для внутрибрюшинного способа введения, который считается близким по скорости наступления эффекта к ректальному, следующие серии экспериментов были посвящены определению фармакокинетических параметров наноаэрозольной формы ибупрофена.

Фармакокинетические параметры при наноаэрозольном введении ибупрофена определяли после установления корректности работы измерительных систем при внутрибрюшинном и пероральном введении препарата. Был определен один из самых главных параметров - время достижения максимальной концентрации, которое составило 20 минут, что превосходит скорость традиционных форм доставки ибупрофена в 2 раза. Время нахождения высокой концентрации в крови в несколько раз превышает аналогичные параметры для иных форм доставки ибупрофена (табл. 13). Среднее время удерживания препарата в крови составило 91,63 мин. Следует отметить, что такой показатель как, C_{max} находился в близких пределах (0,18 мкг/мл) значениям при других способах доставки.

Таблица 13. Фармакокинетические параметры наноаэрозольной формы ибупрофена

Параметры	Единица измерения	Значение
Lambda_z	1/min	0,011
t1/2	min	61,86
Tmax	min	20
Cmax	µg/ml	0,184
Tlag	min	0
Clast_obs/Cmax		0,33
AUC 0-t	µg/ml*min	15,7
AUC 0-inf_obs	µg/ml*min	21,07
AUC 0-t/0-inf_obs		0,75
AUMC 0-inf_obs	µg/ml*min ²	1930,85
MRT 0-inf_obs	min	91,63
Vz/F_obs	(µg)/(µg/ml)	0,01
Cl/F_obs	(µg)/(µg/ml)/min	0,0001

Вид фармакокинетической кривой при наноаэрозольном способе введения существенно отличается от кривых при внутрибрюшинном и пероральном способе их доставки. Основным отличием является снижение концентрации до 0,15 мкг/мл на 40-й минуте с частичным восстановлением до 0,16 мкг/мл к 60-й минуте (рис. 4). Такой тип кривой можно объяснить поэтапной абсорбцией наноаэрозоля в легких. Первый пик повышения концентрации ибупрофена, связан с проникновением наноаэрозоля в периферические отделы легких, где происходит его абсорбция и частичный метаболизм [Agu R.U., et al., 2001].

Падение концентрации ибупрофена можно объяснить тем, что аэрозольные лекарственные формы оказывают большое влияние на чувствительность реснитчатого эпителия дыхательных путей, нарушая естественный клиренс частиц и вызывая спазм мелких бронхов. Это приводит к оседанию и растворению наноаэрозоля в верхних отделах бронхиального дерева и полости рта. Последующий метаболизм препарата осуществляется всасыванием через желудочно-кишечный тракт, что соответствует следующему пику подъема концентрации на рисунке 3 [Benet L.Z., 1978; Henningfield J.E., et al., 1990; Parkinson A., 1996; Patton J.S., et al., 2004; Yu J, Chien Y.W., 2002; Hukkanen J., et al., 2002; Heyder J., 2004].

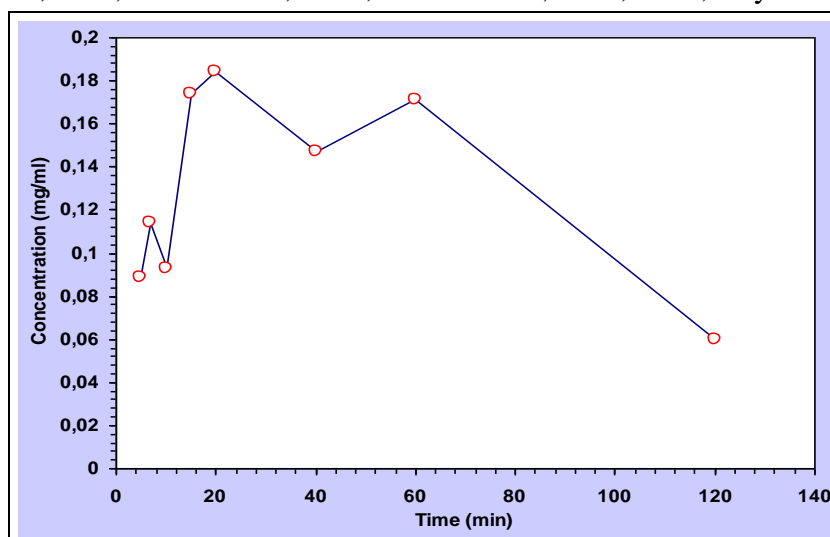


Рис. 4. Фармакокинетическая кривая зависимости концентрации от времени при введении ибупрофена в форме наноаэрозоля.

Падение концентрации наноаэрозоля ибупрофена при дальнейшей экспозиции может быть обусловлено тем, что в периферическом отделе легких имеются защитные механизмы, ограничивающие абсорбцию макромолекул, например захват макрофагами [Серета В.П., Свистов А.С. и др., 2004]. Следует подчеркнуть, что растворы солей, кислот, щелочей, сахаров с концентрацией более 2% угнетают функцию ресничек мерцательного эпителия, не обеспечивают эвакуацию слизи и других элементов из дыхательных путей. На процессы абсорбции в периферических отделах легких большое влияние оказывает рН вдыхаемых аэрозолей: резко кислые и щелочные растворы угнетают всасывание лекарственных веществ [Bygon P.R., Patton J.S., 1994]. Диаметр аэрозольных частиц является наиболее важной характеристикой, влияющей на доставку аэрозоля в дыхательные пути. Осаждение частиц в разных отделах дыхательных путей, в зависимости от размера частиц, представлено на рисунке 5 [Laube V.L. et al., 2011].

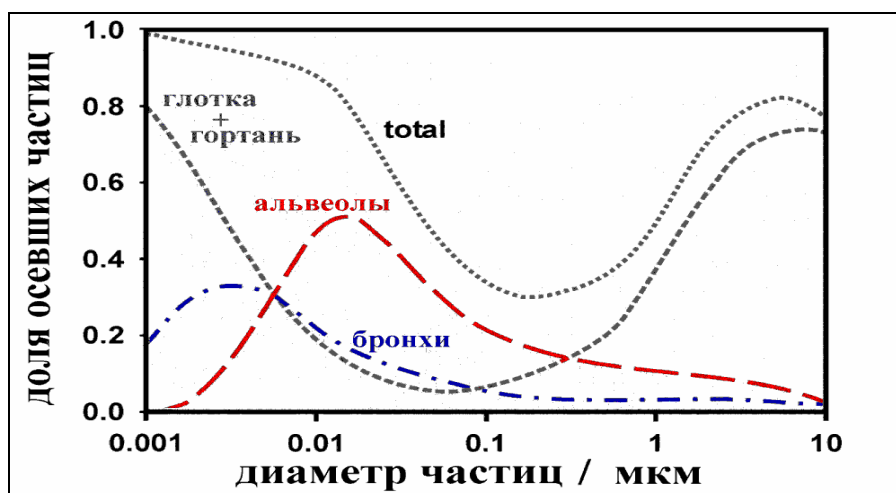


Рис. 5. Доля осевших частиц в разных отделах дыхательных путей в зависимости от размера.

Осаждение частиц от 10 до 100 нм происходит преимущественно в альвеолах, а частицы большего и меньшего диаметра оседают в верхних отделах дыхательных путей [Köbrich R. et al., 1994].

При определении фармакокинетических параметров после часовой экспозиции наблюдается снижение концентрации ибупрофена в сыворотке крови. Для выяснения скорости восстановления концентрации были проведены дополнительные исследования, целью которых было определение в крови концентрации ибупрофена после часовой экспозиции и восстановительного периода через 1-5, 23 и 27 часов с последующей 20-ти минутной экспозицией наноаэрозоля (рис. 6). На основании проведенных исследований установлено, что максимальная концентрация ибупрофена в крови достигается после однократной 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля и сохраняется в крови в течение суток. После 20-ти минутной экспозиции на фоне часовой ингаляции наноаэрозоля и последующих восстановительных периодов в 1-5 часов C_{\max} ибупрофена в крови не достигается.

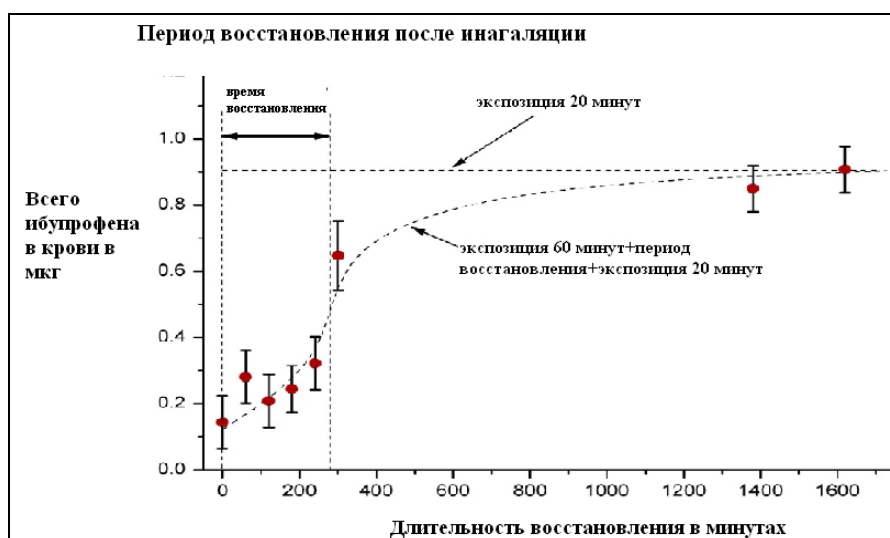


Рис. 6. Динамика поступления в кровь наноибупрофена.

Лишь после 23-27 часового восстановительного периода наблюдается достижение максимальной концентрации ибупрофена, что является лимитирующим фактором и определяет целесообразность повторного введения, не ранее, чем через указанный выше вре-

менной интервал. Из этого следует, что рациональная кратность приема наноаэрозольной формы ибупрофена в эффективной дозе, составляет один раз в сутки.

Таким образом, при анализе фармакокинетических параметров наноаэрозольной формы ибупрофена следует вывод, что терапевтическое действие его сверх малых доз ($2,4 \cdot 10^{-3}$ мг/кг) обусловлено высокой скоростью достижения максимальной концентрации и продолжительностью сохранения в крови в течение 27 часов. Определение фармакокинетики наноаэрозольной формы ибупрофена позволило объяснить эффективность сверх малых доз и установить рациональную кратность приема препарата.

Морфологические изменения в легких после воздействия наноаэрозольной формы ибупрофена в динамике.

Морфология легких контрольной группы. У интактных животных легкие имеют типичное строение. В долевых артериях и венах выявляются признаки полнокровия (физиологического). Слизистая долевых бронхов выстлана высоким призматическим эпителием, подслизистый слой слабо выражен, мышечная оболочка образована гладкомышечными волокнами, адвентиция в виде плотной волокнистой соединительной ткани. Межалвеолярные перегородки тонкие. В мелких бронхах наблюдается выраженная складчатость слизистой. В просвете бронхов выявляются слущенные эпителиоциты, пропитанные слизью в виде субстанции бледно-розового цвета. Просветы терминальных бронхов и альвеол без признаков эмфизематозного расширения. Выявленные изменения в легких могут быть связаны с особенностями забора материала для гистологического исследования.

Морфологическое исследование легких после 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля ибупрофена выявило выраженные дегенеративные изменения в эпителии долевых и сегментарных бронхов. Слизистая оболочка долевых бронхов выстлана многорядным призматическим эпителием, с большим количеством гиперплазированных бокаловидных клеток и характеризуется повышенной складчатостью, что может быть признаком бронхоспазма. Апикальная часть большинства бокаловидных клеток разрушена с выделением их секрета в просвет бронхов в виде гомогенной субстанции бледно-розового цвета. Наблюдается умеренный отек слизистого и подслизистого слоя, в респираторных отделах легких выраженное очаговое полнокровие.

Морфология легких после 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля ибупрофена и 20-ти и 40-ка минут восстановительного периода. Животных в данной группе выводили из эксперимента сразу после 20-ти минутного восстановительного периода. В легких наблюдали периваскулярный и перибронхиальный отек, очаговое полнокровие респираторных отделов. В эпителии долевых и сегментарных бронхов наблюдалось незначительное уменьшение секреторной активности бокаловидных клеток, и спазма мелких ветвей бронхов.

Возможно, это связано с тем, что аэрозоли, проникая в мелкие бронхи и особенно бронхиолы, способны рефлекторно вызвать их сужение. По-видимому, это обусловлено влиянием частиц наноаэрозоля на ворсинки мерцательного эпителия, сгибание которых и вызывает раздражение механорецепторов [Середа В.П. и др., 2004]. В виду того, что легкие постоянно подвергаются воздействию микроорганизмов, ксенобиотиков из окружающей

среды, в результате эволюции возникла сложная защитная система, предохраняющая дыхательные пути на всем протяжении. Такими защитными механизмами верхних дыхательных путей и бронхов являются анатомические барьеры, кашель, мукоцилиарный аппарат, эпителий дыхательных путей, секреторный иммуноглобулин А, сеть дендровидных клеток и лимфоидная структура [Nicod LP., 1999; Labiris N.R., Dolovich M.B., 2003; Heyder J., 2004].

Морфология легких после 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля ибупрофена и 24-х часов восстановительного периода у животных в легких сохраняются явления умеренного полнокровия, отмечается уменьшение секреторной активности эпителия во всех отделах бронхов. Явлений спазма мелких бронхов не наблюдалось, что свидетельствует об обратимости выявленных изменений.

Таким образом, незначительное восстановление структуры легких отмечается через 40 минут, а полное восстановление - через 24 часа после 20-ти минутного воздействия ибупрофена в виде наноаэрозоля.

Морфология легких после 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля ибупрофена трехкратно через 24 часа без восстановительного периода. В легких основные дегенеративные изменения отмечались в долевых и сегментарных бронхах, в которых, наблюдалась выраженная складчатость эпителиального слоя и большое количество гиперплазированных бокаловидных клеток. Апикальная часть большинства бокаловидных клеток разрушена с выделением их секрета в просвет бронхов в виде гомогенной субстанции бледно-розового цвета. В эпителиоцитах выявлялась гидропическая дистрофия, что сопровождалось слущиванием части пораженных клеток в просвет бронхов. На фоне очагового полнокровия перибронхиально и периваскулярно незначительно выражен отек и лимфоцитарная инфильтрация.

Морфология легких после 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля ибупрофена трехкратно через 24 часа с восстановительным периодом 48 часов. В легких животных данной группы отмечалась положительная динамика выявленных ранее изменений. В просвете бронхов наблюдалось уменьшение количества слущенных эпителиоцитов и слизи. Гидропическая дистрофия выявлялась в отдельных клетках, незначительно уменьшились явления бронхоспазма и степень кровенаполнения сосудов. Признаков хронических воспалительных заболеваний у животных не обнаружено. Таким образом, изменения структуры легких в данной группе, не отличались от таковых в группе интактного контроля.

Морфология легких после 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля ибупрофена пятикратно через 24 часа без восстановительного периода. В легких животных данной группы, как и в серии экспериментов с 3 –х кратной 20-ти минутной экспозицией существенных отличий в морфологической картине не отмечалось. Наблюдалась выраженная складчатость слизистых оболочек мелких бронхов с частичной обтурацией их просветов слущенными клетками, слизью, эритроцитами. В стенках крупных бронхов бокаловидные клетки были несколько увеличены в размерах, а в отдельных эпителиоцитах отмечалась гидропическая дистрофия. У всех животных в группе наблюдался незначительный периваскулярный и перибронхиальный отек тканей и полнокровие.

Морфология легких после 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля ибупрофена пятикратно через 24 часа с восстановительным периодом 48 часов. В легких отмечалось существенное уменьшение выраженности деструктивных изменений. Также как и в группе,

после 3-х дневного введения ибупрофена с восстановительным периодом 48 часов, наблюдалось восстановление слизистой оболочки бронхов. В просвете бронхов незначительно уменьшилось количество слущенных клеток, слизи, а также явления полнокровия и отека. Аналогичные морфологические изменения наблюдались и у контрольных животных.

Таким образом, выявленные изменения как после короткого, так и после длительного введения ибупрофена в слизистых оболочках бронхов имеют обратимый характер.

Морфология легких после 60-ти минутной экспозиции наноаэрозоля ибупрофена с восстановительным периодом 5 часов с последующей 20-ти минутной экспозицией. Концентрация вдыхаемого аэрозоля в течение часа была эквивалентна концентрации аэрозоля при 20 – минутной экспозиции. В легких у всех животных наблюдались признаки незначительного полнокровия, что может быть связано с забором материала для исследования. В бронхах отмечалось незначительное слущивание поверхностных слоев эпителия с пропитыванием их слизистым секретом в виде субстанции бледно-розового цвета, что мы наблюдали ранее в группе интактного контроля. Признаков патологических изменений не обнаружено.

Выявленные изменения в легких объясняются тем, что часть поглощенных частиц оседают в мелких бронхах и бронхиолах [Scheuch G, Siekmeier R., 2007]. После осаждения они быстро транспортируются в трахею механизмами мукоцилиарного транспорта и далее попадают в желудочно-кишечный тракт. Показано, что толщина слоя слизи и эпителия дыхательных путей, а также пероксидазная активность, уменьшают абсорбцию биомолекул, осаждающихся в центральных воздухоносных путях [Oberdörster G. et al., 2005; Wong B.A., 2007; Hussain M., Madl P., Khan A., 2011].

Наиболее благоприятные условия для абсорбции ингалируемых веществ наблюдаются в периферическом отделе легких, что связано с размером поверхности альвеол, толщиной альвеолярного эпителия, проницаемостью и высокой перфузией легких кровью без эффекта «первого прохождения», который наблюдается при пероральном введении лекарственных средств [Valente AXCN, 2003]. Однако и в периферическом отделе легких имеются защитные механизмы, ограничивающие абсорбцию макромолекул, например захват макрофагами [Серета В.П., Свистов А.С. и др., 2004].

Морфология легких после 60-ти минутной экспозиции наноаэрозоля ибупрофена с восстановительным периодом 23 и 27 часов и с последующей 20-ти минутной экспозицией. У всех животных в легких не наблюдалось дегенеративных изменений в крупных бронхах и альвеолах, лишь в мелких бронхах отмечалось незначительное количество слизи. Патологических изменений в легких у животных также не было выявлено.

Таким образом, изменения в легких после 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля независимо от его предшествующего 60-ти минутного введения с последующим восстановительным периодом различной продолжительности идентичны таковым при однократном 20-ти минутном введении. Это являлось свидетельством отсутствия токсического воздействия на ткань легкого, а обнаруженные изменения носили полностью обратимый характер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований, установлено, что новая аэрозольная форма доставки позволила снизить терапевтически эффективную дозу ибупрофена, диклофенака

натрия, бутадiona, индометацина от $3,3 \cdot 10^4$ до $1,9 \cdot 10^9$ раз по сравнению с их традиционной пероральной формой. По результатам скрининга для дальнейшего изучения, был выбран ибупрофен, так как противовоспалительная и анальгетическая активность его наноаэрозольной формы была выявлена в одной дозе.

На основании проведенных фармакокинетических исследований установлено, что высокая активность ибупрофена в наноаэрозольной форме связана с двукратным увеличением скорости достижения максимальной концентрации в крови и показателя площади под кривой (концентрация / время) по сравнению с другими формами доставки. Показано, что максимальная концентрация ибупрофена достигается после однократной 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля и сохраняется в крови в течение суток. Впервые установлена рациональная кратность приема наноаэрозольной формы ибупрофена в эффективной дозе, которая составляет один раз в сутки. После воздействия наноаэрозольной формы ибупрофена все структурные изменения тканей легких имеют обратимый характер.

Таким образом, наноаэрозольная форма ибупрофена рекомендована для дальнейших доклинических исследований в качестве перспективной малотоксичной и быстродействующей лекарственной формы. Предлагаемый технологический подход в дальнейшем позволит создавать наноаэрозольные формы других фармакологических групп препаратов с целью снижения терапевтической дозы, и, как следствие, их побочных эффектов, а также расширить область применения.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено изучение анальгетической и противовоспалительной активности наноаэрозольной формы диклофенака натрия, ибупрофена, индометацина, бутадiona и показано, что введение НПВС в наноаэрозольной форме уменьшает их эффективную дозу в $3,3 \cdot 10^4$ - $1,9 \cdot 10^9$ раз по сравнению с традиционными способами доставки.
2. Установлено, что ибупрофен в наноаэрозольной форме является наиболее перспективным препаратом с точки зрения фармакоэкономической значимости, для которого впервые определены фармакокинетические параметры и токсичность.
3. Показано, что максимальная концентрация ибупрофена достигается после однократной 20-ти минутной экспозиции наноаэрозоля.
4. Установлено, что высокая активность ибупрофена в наноаэрозольной форме связана с увеличением скорости достижения максимальной концентрации в крови и показателя площади под кривой (концентрация / время) по сравнению с другими формами доставки, что свидетельствует о повышении его биодоступности.
5. Определена рациональная кратность введения наноаэрозольной формы ибупрофена в эффективной дозе один раз в сутки.
6. Установлено, что после воздействия наноаэрозольной формы ибупрофена все структурные изменения тканей легких имеют обратимый характер.
7. Наноаэрозольная форма ибупрофена рекомендована для дальнейших доклинических исследований в качестве перспективной малотоксичной и быстродействующей лекарственной формы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Толстикова Т.Г. Фармакологические свойства наноаэрозольных лекарственных препаратов / **С.В. Аньков**, М.В. Хвостов, С.Г. Матвеева // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы международной конференции. – Москва, 2013. – С. 164.
2. Толстикова Т.Г. Фармакологические свойства наноаэрозольных лекарственных препаратов / **С.В. Аньков**, М.В. Хвостов, С.Г. Матвеева // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции. - Ялта-Гурзуф, 2013. – С. 145-146.
3. Khvostov M.V. Nanoaerosol as a promising delivery way of water insoluble drugs Drug Absorbption, Nanoaerosol as a promising delivery way of water insoluble drugs / T.G. Tolstikova, **S.V. Ankov**, A.A. Onischuk, A.M. Baklanov // Drug Absorbption, Transport and Delivery (WCDATD): Responding to Challenging Situations. - Uppsala-Sweden, 2013. – P. 75.
4. **Аньков С.В.** Влияние наноаэрозольной формы доставки на фармакологические свойства нестероидных противовоспалительных препаратов и некоторых психотропных средств / М.В. Хвостов, С.Г. Матвеева, Т.Г. Толстикова, А.А. Онищук // Фундаментальные науки медицине. Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. - Новосибирск, 2014. – С. 114-115.
5. **Аньков С.В.** Влияние наноаэрозольной формы лекарственных препаратов на их базовую активность / Т.Г. Толстикова, М.В. Хвостов, А.А. Онищук, А.М. Бакланов, В.В. Болдырев // Химия в интересах устойчивого развития. - 2014. - №22. - С. 223-227.
6. Onischuk A.A. Generation, inhalation delivery and anti- hypertensive effect of nisoldipine nanoaerosol / T.G. Tolstikova, A.M. Baklanov, M.V. Khvostov, I.V. Sorokina, N.A. Zhukova, **S.V. An'kov**, O.V. Borovkova, G.G. Dultseva, V.V. Boldyrev, V.M. Fomin, G. Steven Huang // Journal of Aerosol science. - 2014. - №78. - P. 41-55.
7. **Аньков С.В.** Токсико-фармакологические свойства наноаэрозольной формы нестероидных противовоспалительных средств / Т.Г. Толстикова, А.А. Онищук, Н.А. Жукова, М.В. Хвостов // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции IT + M&Ec'2015. - Гурзуф, 2015. - С. 239-244.
8. **Аньков С.В.** Анальгетический эффект наноаэрозольной формы некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов / Т.Г. Толстикова, А.А. Онищук, М.В. Хвостов, И.В. Сорокина, А.М. Бакланов, В.В. Болдырев, В.М. Фомин // Химико-фармацевтический журнал. - 2015. – Т. 49. - № 10. – С. 76-78.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

%УБР – процент угнетения болевой реакции

ЦОГ – циклооксигеназа

УК – тест «уксусные корчи»

ГП – тест «горячая пластина»

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДСА – диффузионный спектрометр аэрозоля

НО – камера «nose only»

WB – камера «whole body»

AUC - area under the curve (площадь под кривой)

MRT - mean residence time (среднее время удерживания)

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат

ПГ - простагландин

ЦНС – центральная нервная система

Н/А - наноаэрозоль