

Biofarmaceutyczna ocena bupiwakainy inkorporowanej w postaci mikrosfer polimerowych

Monika Balcerkiewicz¹, Edmund Grześkowiak¹, Pascal Le Corre², Maja Ratajczak-Enselme², Anna Wolc³, Karol Szlufik¹

¹ Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

² Laboratoire de Pharmacie Galenique et Biopharmacie Université de Reenes

³ Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Adres do korespondencji: Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. św. Marii Magdaleny 14, 61-861 Poznań, tel: (0-61) 852-90-57

Środki do miejscowego znieczulenia dzięki możliwościom blokowania przewodnictwa w nerwach obwodowych, korzeniach i zwojach międzykręgowych, znajdują obecnie szerokie zastosowanie zarówno w znieczuleniu do zabiegów chirurgicznych, jak i w zwalczaniu bólu o różnej etiologii. Spośród leków tej grupy najczęściej stosowana w większości technik znieczulenia miejscowego jest bupiwakaina (BP). Lek ten charakteryzuje się szybkim, silnym i długotrwałym efektem znieczulającym, a szybkość, czas oraz siła i zasięg znieczulenia zależą od miejsca podania i zastosowanej dawki leku [1–3]. Właściwości farmakologiczno-farmakodynamiczne BP sprawiają, że jest ona szczególnie przydatna, gdy wymagane jest uzyskanie długiego znieczulenia i ograniczonej blokady motorycznej. Najczęściej stosowana jest zatem w celu wywołania znieczulenia przewodowego, nasiękowego, nerwów obwodowych i splotów nerwowych do zabiegów operacyjnych w chirurgii, położnictwie, stomatologii, urologii i okulistyce oraz w celu zwalczania ostrego bólu pooperacyjnego, porodowego i nowotworowego. Efekt przedłużonego znieczulenia jest najczęściej uzyskiwany w wyniku zastosowania techniki powtarzalnych dawek frakcjonowanych lub ciągłego wlewu przez cewnik umieszczony w przestrzeni zewnątrzoponowej. Właściwie dobrana dawka i prawidłowo wykonana blokada najczęściej nie powodują wystąpienia objawów toksycznych. Kardio- i neurotoksyczne działanie BP jest zwykle następstwem niezamierzonego wstrzyknięcia donaczyniowego, podania zbyt dużej dawki lub zbyt szybkiego podania leku [4–6].

Ponadto w porównaniu z innymi środkami znieczulenia regionalnego, BP podana miejscowo jest znacznie bardziej od nich toksyczna. Przyjmuje się, że przy osiąganym stężeniu w osoczu w zakresie 2–4 µg/ml istnieje duże prawdopodobieństwo wystąpienia pierwszych objawów toksyczności ogólnoustrojowej.

Biopharmaceutic assessment of bupivacaine incorporation into polymeric microspheres

Aim: Bupivacaine is an amide type local anesthetics widely used in surgery and obstetrics for sustained central and peripheral nerve blockade. However, its use is limited by its systemic toxicity related to high drug plasma concentrations resulting from a fast systemic absorption. Improvement of regional administration of local anesthetic formulations could be obtained by their incorporation in controlled delivery systems such as implants, liposomes, drug complexes with cyclodextrins and microspheres. The aim of the present study was to determine the reduced systemic absorption leading to high plasma concentrationa related to central nervous and cardiovascular toxicity and prolong the duration of action of bupivacaine through the modification of this pharmacokinetics by its application as polymeric microspheres. **Results:** We evaluated in rabbits the bupivacaine pharmacokinetics: in first stage after 15 minutes intravenous infusion of 5 mg bupivacaine solution and after intravenous injections of 5 mg bupivacaine-loaded microspheres (type I), in second stages after intramuscular injections of 5 mg bupivacaine in solution and after intramuscular injections of 5 mg bupivacaine-loaded microspheres (type I and II). Blood samples were collected at several time points. Plasma concentration of BP were measured by HPLC with hydrochloride ropivacaine as internal standard. **Conclusion:** Obtained data indicates that bupivacaine is realeased from microspheres in prolonged and controlled way that is characterized by beneficial bioaccess parameters for anesthetics locale.

Keywords: microspheres, bupivacaine, anesthetics locale, PLGA

© Farm Pol, 2009, 65(3): 163-170

Podwyższone stężenie BP w osoczu powoduje charakterystyczny zespół objawów, związanych z zaburzeniami czynności ośrodkowego układu nerwowego (OUN) oraz pracy serca. Średnia dożylna dawka letalna dla BP ustalona w badaniach na zwierzętach wyniosła 156 mg w porównaniu z 1450 mg dla lidokainy,

innego leku z tej grupy. Śmierć zwierząt następowała z powodu komorowych zaburzeń rytmu o nagłym przebiegu, a stężenie BP oznaczone w mięśniu sercowym martwych zwierząt stanowiło 3,3% podanej dawki [7–8].

Środki miejscowego znieczulenia łatwo przechodzą przez barierę krew-mózg, dlatego zaburzenia ze strony ośrodkowego układu nerwowego zazwyczaj pojawiają się wcześniej i przy niższych stężeniach niż zaburzenia ze strony układu krążenia. Im silniejsze jest znieczulające działanie leku, tym większe jest jego toksyczne oddziaływanie na OUN. Bupiwakaina w stężeniu toksycznym wywołuje w pierwszej fazie pobudzenie, a przy dalszym wzroście stężenia depresję OUN ze śpiączką i zatrzymaniem oddechu, w wyniku ośrodkowego porażenia oddychania. Mięsień sercowy jest mniej wrażliwy na działanie anestetyków lokalnych niż mózg, dlatego objawy ośrodkowe występują zazwyczaj wcześniej niż objawy ze strony układu krążenia. Dawki wywołujące drgawki zwykle tylko nieznacznie wpływają na upośledzenie czynności układu krążenia. Zdarza się jednak, że objawy kardiotoxyczne pojawiają się bez uprzednich objawów ośrodkowych i wówczas BP może wywołać arytmie komorowe przy znacznie niższym stężeniu substancji czynnej w osoczu niż wywołującym drgawki [7–9].

W celu uzyskania bezpiecznej oraz efektywnej analgezji przewodowej jak dotąd zbadano wiele nowoczesnych postaci leku, odznaczających się kontrolowanym uwalnianiem substancji leczniczej. Wyniki tych prac wskazują na wysoką przydatność w praktyce anestetycznej systemów mikrokompartamentowych. Powodem jest możliwość znacznego obniżenia toksyczności oraz wydłużenia czasu działania substancji leczniczej podanej w postaci leku wielozbiornikowego. W takim systemie dawka substancji leczniczej jest rozdzielona między liczne mikrocząstki stanowiące jej nośnik lub zbiornik, przewyższając tradycyjne jednozbiornikowe postaci leku pod względem efektywniejszej kontroli procesów uwalniania i wchłaniania [10, 11].

W doświadczeniach prowadzonych na modelach zwierzęcych testowano między innymi implanty, liposomy, kompleksy inkluzyjne z cyklodekstrynami, nośniki lipidowe czy mikrosfery lipidowe. W badaniach przedklinicznych dobre rezultaty przyniosło wykorzystanie m.in. mikrosfer polimerowych z inkorporowanym środkiem znieczulenia regionalnego. Wyniki tych badań sugerują, że inkorporowanie leku w postaci mikrosfer polimerowych pozwala na modyfikację jego farmakokinetyki, a przez to przedłużenie działania znieczulającego i przeciwbólowego oraz zmniejszenie

ryzyka wystąpienia objawów toksyczności substancji leczniczej [12–16].

Mikrosfery są zaliczane do formułacji leku o budowie wielozbiornikowej charakteryzujących się przedłużonym uwalnianiem substancji czynnej. Postacie te są zbudowane z różnego rodzaju matryc, w których substancja lecznicza jest rozpuszczona bądź zawieszona. W odróżnieniu od mikrokapsulek, w których substancja lecznicza w postaci stałej lub płynnej jest otoczona błoną polimerową, w mikrosferach lek jest inkorporowany w matrycy, którą mogą stanowić syntetyczne lub naturalne polimery, a przy zastosowaniu liposfer – lipidy. Zależnie od wielkości cząstek, mikrosfery mogą być aplikowane różnymi drogami. Jednak najczęściej znajdują zastosowanie jako leki do podawania pozajelitowego, zatem stosowane do ich wytwarzania matryce muszą być zgodne z tkankami i ulegać całkowitej biodegradacji. Mechanizm procesu biodegradacji jest uzależniony od rodzaju matrycy oraz drogi podania leku i może mieć charakter chemiczny, fizyczny lub enzymatyczny. Matryce lipidowe w porównaniu z polimerowymi należą do bardziej biodegradacyjnych, przez co liposfery kumulują się w organizmie w mniejszym stopniu niż mikrosfery polimerowe [11, 17]. Efekt przedłużonego uwalniania po zastosowaniu leku w postaci mikrosfer pozwala na utrzymanie odpowiednich stężeń we krwi przez określony czas, wpływając tym samym na przedłużenie działania terapeutycznego. Uwalnianie substancji leczniczej z matrycy lipidowej następuje w zależności od preparatu, w czasie od kilku dni do 6 tygodni, natomiast inkorporowanie substancji leczniczej do matrycy polimerowej wydłuża ten czas nawet do 4 miesięcy. Czas uwalniania substancji czynnej determinuje zatem częstość podania leku, wpływając w przypadku leku zastosowanego w postaci mikrosfer na wydłużenie przedziału dawkowania w porównaniu z tradycyjnymi postaciami leku [10, 18].

Substancje wykorzystywane w konstruowaniu mikrocząstek powinny być zgodne z tkankami, wykazywać odpowiednie właściwości mechaniczne i przewidywalny profil uwalniania leku. Jako matryce polimerowe do sporządzania mikrosfer stosuje się zatem związki wielkocząsteczkowe, pochodzenia naturalnego lub syntetyczne, należące do różnych grup chemicznych. Największe możliwości aplikacyjne stwarzają jednak mikrosfery, których matryce otrzymywane są z polimerów biodegradowalnych. Wśród nich największe znaczenie praktyczne mają biodegradowalne, syntetyczne poliestry β - i α -hydroksykwasów, szczególnie mlekowego i glikolowego, ich kopolimery oraz naturalne polimery, jak proteiny czy polisacharydy. Kopolimeryzacja D,L-laktydów i glikolidów niszczy strukturę krystaliczną, przyspieszając tym samym hydrolizę i biodegradację matrycy. Najkorzystniejszą kinetykę rozpadu wykazuje kopolimer PLGA w proporcji 50:50. Dalsze zwiększanie zawartości

Środki miejscowego znieczulenia łatwo przechodzą przez barierę krew-mózg, dlatego zaburzenia ze strony ośrodkowego układu nerwowego zazwyczaj pojawiają się wcześniej i przy niższych stężeniach niż zaburzenia ze strony układu krążenia. Im silniejsze jest znieczulające działanie leku, tym większe jest jego toksyczne oddziaływanie na OUN.

jednostek glikolowych spowalnia jednak hydrolizę z powodu wzrostu stopnia krystalizacji [19].

Uwalnianie substancji leczniczej następuje przede wszystkim powierzchniowo, w efekcie powierzchniowej erozji matrycy polimerowej i jednoczesnej dyfuzji leku. Po podaniu domięśniowym lub implantacji, mikrosfery poliestrowe ulegają biodegeneracji w płynie tkankowym na drodze hydrolizy autokatalitycznej. Z nierozpuszczalnych makrocząstek w wyniku hydrolytycznej deestryfikacji powstają małe fragmenty rozpuszczalnych oligo- i monomerów, które dyfundują do otaczającego środowiska. Równocześnie wnika- jąca w strukturę wewnętrzną polimeru woda powoduje powolną degradację łańcucha polimerowego. Matryca stopniowo traci swą pierwotną spójność, a powstające w ten sposób mikrokanaly sprzyjają dyfuzji leku. Tym samym w miarę redukcji masy matrycy droga dyfuzji leku staje się coraz krótsza [19]. Szybkość hydrolizy łańcuchów polimerowych zależy w dużym stopniu od pH i temperatury, dlatego w warunkach *in vivo* obserwuje się minimalne różnice szybkości rozpadu mikrosfer, zależne od drogi ich podania. Hydroliza enzymatyczna odgrywa niewielką rolę w procesie rozpadu matryc poliestrowych, prawdopodobnie większą dla amorficznych odmian polimerów [20]. Badania podstawowe oraz wieloletnie doświadczenie kliniczne potwierdziły bezpieczeństwo i dużą przydatność polimerów hydroksykwasów jako materiału implantacyjnego. Mikrosfery wykonane z polimerów PLA, PGA oraz PLGA są całkowicie bioresorbowalne i doskonale tolerowane przez organizm. Hydroliza wiązań estrowych w warunkach *in vivo* prowadzi do powstania monomerów kwasów hydroksylowych, które następnie zostają włączone do cyklu Krebsa i wydalone w formie nieszkodliwych produktów przemiany materii. Mikrosfery polimerowe mogą jednak powodować łagodny odczyn tkankowy, jednak bez miejscowego i uogólnionego stanu zapalnego [20–22].

Mikrosfery jako układy mikrokompartm- entowe znalazły zastosowanie głównie jako pozajelitowe postaci leku o przedłużonym i kontrolowanym uwalnianiu, aplikowane różnymi drogami. Zawieszony w odpowiednim środowisku mikrosfery wielkości 1–8 μm lub mniejsze od 1 μm , tzw. nanosfery, mogą być podane dożylnie, mikrosfery wielkości 10–150 μm można zastosować podskórnie lub domięśniowo, natomiast o wielkości 100–500 μm mogą służyć do embolizacji naczyń [11]. Mikrosfery zapewniają dłuższy czas uwalniania substancji leczniczej niż zawiesiny czy roztwory o zwiększonej lepkości, a ich zaletą w porównaniu z implantami jest możliwość iniekcyjnej aplikacji bez ingerencji chirurgicznej. Przedłużony profil uwalniania leku z mikrosfer sprawia, że mogą one stanowić korzystny system dozowania substancji leczniczych w leczeniu chorób przewlekłych, a także dla leków charakteryzujących się małą dostępnością

biologiczną po podaniu doustnym, bądź substancji o krótkim okresie biologicznego półtrwania [17, 23].

Do substancji leczniczych najczęściej inkorporowanych w biodegradowalnych matrycach mikrosfer zalicza się przede wszystkim cytostatyki i analogi hormonów stosowane w leczeniu nowotworów hormonozależnych. Aplikacja mikrosfer zawierających cytostatyki w naczyniowej embolizacji pozwala na prowadzenie terapii celowanej, charakteryzującej się mniejszym ryzykiem toksyczności ogólnoustrojowej. Wiele innych substancji leczniczych, którym nadano formę mikrosfer zostało pozytywnie zweryfikowanych w doświadczeniach z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych. Niektóre z nich zostały wprowadzone do lecznictwa, w postaci mikrosfer przeznaczonych do podania podskórnego lub domięśniowego w formie zawiesiny [18, 24].

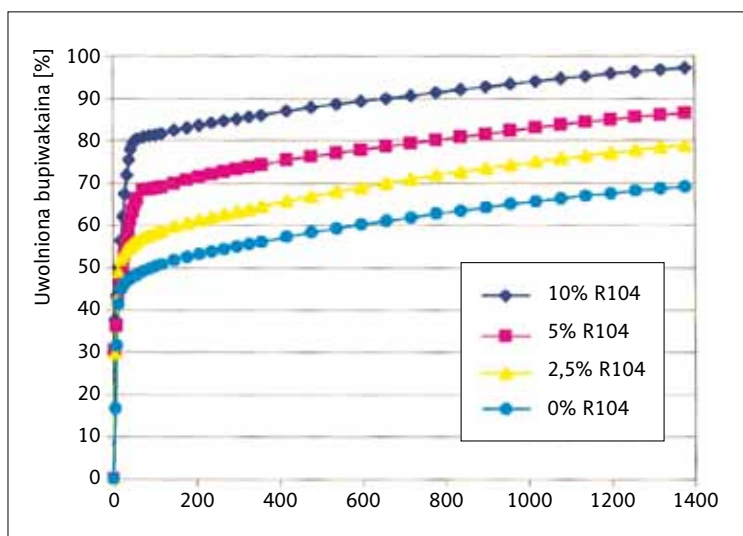
Cel pracy

Celem pracy było określenie za pomocą doświadczalnych modeli zwierzęcych wpływu inkorporowania BP w matrycy polimerowej mikrosfer na biodostępność uwolnionej z nich substancji czynnej. Kolejne etapy badań miały umożliwić realizację założonego celu poprzez określenie wpływu zastosowania BP w postaci mikrosfer polimerowych typu I i II na farmakokinetykę substancji leczniczej, wykazanie ograniczonej absorpcji substancji leczniczej do krążenia ogólnego, potwierdzenie spowolnienia eliminacji substancji leczniczej z organizmu oraz zbadanie, czy niezamierzone wprowadzenie do krążenia ogólnego BP w postaci mikrosfer polimerowych wiąże się z mniejszym ryzykiem wystąpienia objawów działania toksycznego.

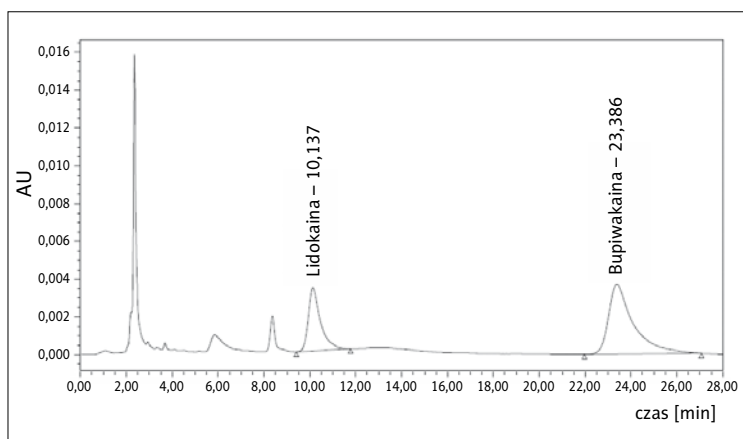
Materiał i metodyka

Badania zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Badań na Zwierzętach i zrealizowane w Katedrze i Zakładzie Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badane mikrosfery (PLGA z inkorporowaną BP) typu I – MSBP 1 (BP/Medisorb 50/50 low IV, proporcje BP/polimer – 40/60) i typu II – MSBP 2 (BP/ Medisorb 50/50 low IV + 180 mg – 10% R 104, proporcje BP/ mieszanina polimerów – 40/60) otrzymano w Laboratoire de Pharmacie Galenique et Biopharmacie Université de Rennes [25]. Badania *in vivo* wykonane w ramach niniejszej pracy przeprowadzono z wykorzystaniem modelu zwierzęcego, królików rasy nowozelandzkiej, obojga płci, o znanej masie ciała. Zwierzęta były karmione

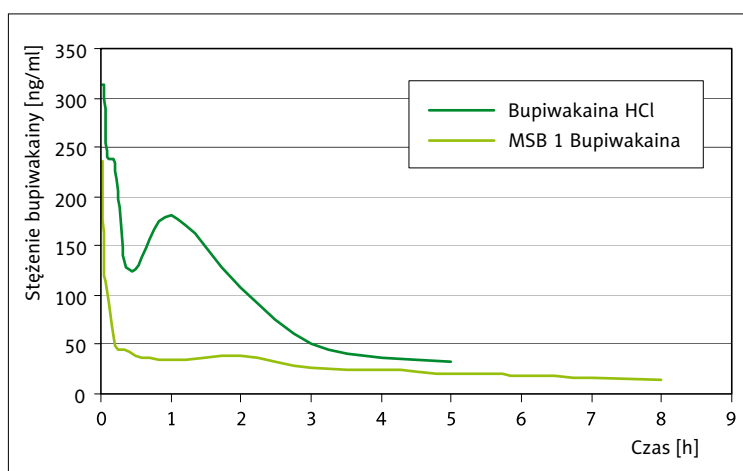
W celu uzyskania bezpiecznej oraz efektywnej analgezji przewodowej jak dotąd zbadano wiele nowoczesnych postaci leku, odznaczających się kontrolowanym uwalnianiem substancji leczniczej. Wyniki tych prac wskazują na wysoką przydatność w praktyce anesteziologicznej systemów mikrokompartmentowych.



Rycina 1. Profile średnie ($n=3$) skumulowanego uwalniania bupiwakainy z mikrosfer z polimeru Medisorb 50/50 low IV o stosunku substancji czynnej do polimeru 40/60 jako funkcja stężenia polimeru R 104 [28]



Rycina 2. Przykładowy chromatogram (I i II etap – metoda HPLC) osocza obciążonego badaną substancją i wzorcem; (czasy retencji: badana substancja – 23,386 min, wzorzec wewnętrzny – 10,137 min)



Rycina 3. Średnie stężenia bupiwakainy w osoczu krwi królików po dożylnym podaniu leku w postaci chlorowodoru ($n=5$) oraz dyspersji wodnej mikrosfer polimerowych typu I ($n=5$) – etap I

pełnowartościową paszą, natomiast 24 h przed rozpoczęciem badań zwierzętom pozostawiano jedynie nieograniczony dostęp do wody. Doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt zostały poprzedzone adaptacją i walidacją chromatograficznej metody oznaczania substancji leczniczej w osoczu krwi królików. Porównanie farmakokinetyki BP uwolnionej z mikrosfer polimerowych przeprowadzono w dwóch etapach.

Celem porównania procesów kinetycznych BP uwolnionej z mikrosfer polimerowych typu I po podaniu dożylnym doświadczenie przeprowadzono w dwóch grupach królików. Pierwszą grupę stanowiło 5 królików o masie ciała $3,8 \pm 0,5$ kg, którym podano dożylnie chlorowodorek BP w dawce 5 mg. Z powodu wysokiej kardio- i neurotoksyczności, która przy planowanym podaniu dożylnym badanej substancji leczniczej mogłaby skutkować śmiercią zwierząt [26], lek podano w postaci 15-minutowej infuzji dożylnej (0,1% roztwór wodny). Doświadczenie polegające na dożylnym podaniu BP w postaci mikrosfer polimerowych typu I przeprowadzono w grupie 5 królików ($4,2 \pm 0,2$ kg). Zwierzętom podano preparat w dawce odpowiadającej 5 mg w przeliczeniu na wolną BP. W obu grupach królików próbki krwi pobierano bezpośrednio przed podaniem leku (próbka zerowa), po 0,02; 0,05, 0,08, 0,17, 0,25, 0,33, 0,50, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 i 5,00 h od momentu podania preparatów oraz dodatkowo po 0,13, 0,75, 1,50 i 2,50 h w pierwszej grupie zwierząt i po 4,50, 5,5, 6,00, 7,00 i 8,00 h w grupie II.

W celu porównania procesów kinetycznych BP uwolnionej z mikrosfer polimerowych typu I i II po podaniu domięśniowym przeprowadzono badanie w trzech grupach królików. Pierwszą grupę stanowiło 8 królików o masie ciała $3,4 \pm 0,4$ kg, którym podano domięśniowo 0,5% chlorowodorek BP w dawce 5 mg. Drugą grupę stanowiło 6 królików o masie ciała $3,6 \pm 0,3$ kg, u których zastosowano BP w postaci iniekcji domięśniowej mikrosfer polimerowych typu I w dawce 5 mg w przeliczeniu na wolną substancję leczniczą. Doświadczenie polegające na domięśniowym podaniu BP w postaci mikrosfer polimerowych typu II przeprowadzono w grupie 5 królików ($4,0 \pm 0,4$ kg). Zwierzętom podano preparat w dawce odpowiadającej 5 mg w przeliczeniu na wolną BP. Próbkę krwi pobierano bezpośrednio przed podaniem leku (próbka zerowa) oraz po 0,02, 0,05, 0,08, 0,17, 0,25, 0,33, 0,50, 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 i 5,00 h od momentu podania leku. W drugiej i trzeciej grupie zwierząt pobrania krwi dokonano także po 6,00, 10,00, 24,00 i 30,00 h od chwili podania leku. Badania kinetyki uwalniania substancji czynnej *in vitro* z badanych mikrosfer (**rycina 1**) [25] potwierdziły wydłużenie drugiej, tzw. wolnej fazy uwalniania, toteż dodatkowo pobrano krew w pierwszym tygodniu w odstępach 24-godzinnych i w czasie dwóch miesięcy od dnia przeprowadzenia doświadczenia – w odstępach tygodniowych.

Krew pobierano do probówek heparynizowanych, następnie wirowano i rozdzielano osocze, które zamrażano i przechowywano w temperaturze -30°C do momentu wykonania analizy. W celu oznaczenia stężenia leku uwolnionego z badanych postaci zastosowano zaadaptowaną i zwalidowaną metodę HPLC opisaną przez Lorec i wsp. [27] oraz Tanaka i wsp. [28]. Badaną substancję poddano ekstrakcji z fazy wodnej do organicznej, a następnie po odparowaniu tej fazy w strumieniu azotu suchą pozostałość rozpuszczono w fazie ruchomej. Na kolumnę chromatografu wyposażonego w detektor UV-VIS nastrzykiwano próbki o objętości 50 µl, używając jako wzorca wewnętrznego roztworu chlorowodoru ropiwakainy o stężeniu 10 µg/ml (ryciny 2 i 3). Wszystkie pomiary, obliczenia oraz automatyczne integracje powierzchni sygnałów opracowano przy użyciu programu komputerowego Empower Pro.

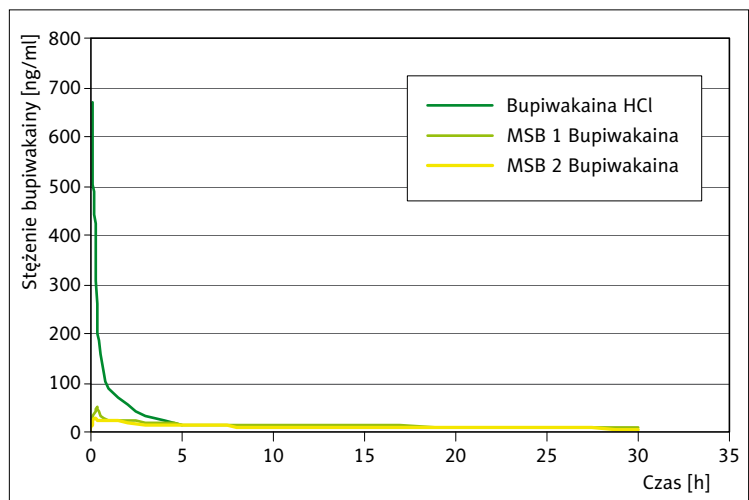
Wyniki

Na podstawie wartości oznaczonych stężeń przeprowadzono analizę farmakokinetyczną indywidualnych krzywych zależności stężenia od czasu. Średnie wartości stężenia BP uzyskane w I i II etapie doświadczenia przedstawiono w postaci wykresu (ryciny 3 i 4).

W celu oszacowania wartości parametrów farmakokinetycznych charakteryzujących badaną substancję leczniczą wykorzystano różne metody matematyczne (model hybrydowy). Dzięki nim możliwe było wyznaczenie parametrów opisujących farmakokinetykę BP, tj. AUC, AUMC, MRT, k_{el} , $t_{0,5}$, V_d i Cl. Wartości parametrów C_{max} i t_{max} odczytano bezpośrednio z indywidualnych krzywych $C=f(t)$. Pole powierzchni pod krzywą opisującą zmiany stężenia leku we krwi w czasie wyznaczono metodą trapezów. Wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych wymaganych do oceny biodostępności umożliwiło określenie względnej dostępności biologicznej badanej substancji leczniczej zastosowanej w postaci mikrosfer polimerowych (F_r). W kolejnych etapach badania wyniosła ona odpowiednio: MSBP 1 *i.v.* – 0,31, MSBP 1 *i.m.* – 0,52 oraz MSBP 2 *i.m.* – 0,30.

Wartości parametrów farmakokinetycznych BP uzyskane w kolejnych etapach badania zamieszczono w tabelach 1 i 2.

W ocenie statystycznej stężeń badanych substancji leczniczych oraz ich parametrów farmakokinetycznych wykorzystano statystyczny program komputerowy SAS (SAS, 2002–2003). W obrębie porównywanych grup zweryfikowano normalność rozkładu przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Ponieważ dla większości analizowanych zmiennych rozkład nie odbiegał istotnie od normalnego, dlatego szczegółowe porównania danych w obrębie grup wykonano w oparciu o test t-Studenta dla par danych (poziom



Rycina 4. Średnie stężenia bupiwakainy w osoczu krwi królików po domięśniowym podaniu leku w postaci chlorowodoru (n=8) oraz dyspersji wodnej mikrosfer polimerowych typu I – MSB 1 (n=6) i typu II – MSB 2 (n=5) – etap II

istotności $\alpha = 0,05$). Istotność różnic między badanymi postaciami leku oraz wpływ drogi ich podania wykonano wykorzystując analizę wariancji ANOVA.

Wyniki oceny statystycznej dla uzyskanych danych zamieszczono w tabelach 1 i 2.

Omówienie wyników

Powszechną obecnie praktyką kliniczną jest stosowanie w leczeniu bólu porodowego, okołoo- oraz pooperacyjnego ciągłego znieczulenia zewnątrzoponowego. Jego alternatywą mogłoby być podanie jednorazowej dawki środka znieczulenia miejscowego w postaci mikrosfer polimerowych, która ograniczyłaby wchłanianie substancji leczniczej do krwiobiegu, zmniejszając w ten sposób

Tabela 1. Analiza farmakokinetyczna z oceną statystyczną średnich wartości parametrów uzyskanych po dożylnym podaniu bupiwakainy w postaci chlorowodoru – BP oraz dyspersji wodnej mikrosfer polimerowych typu I – MSB 1 (etap I)

Parametry	BP		MSB 1		Analiza statystyczna Test t - Studenta
	S	SD	S	SD	
C_{max} [ng/ml]	774,93	215,13	235,33	19,72	IS
t_{max} [h]	0,01	0,01	0,02	-	X
K_{el} [1/h]	0,5523	0,1136	0,2162	0,0848	IS
AUC_{0-5h} [ng×h/ml]	461,55	45,21	143,77	47,60	IS
AUC_{0-8h} [ng×h/ml]	-	-	161,85	69,13	X
AUC_{tot} [ng×h/ml]	540,65	68,28	223,30	65,21	IS
$AUMC_{tot}$ [ng×h ² /ml]	1115,64	367,61	1187,06	327,78	NS
MRT [h]	2,03	0,41	5,39	0,88	IS
$t_{0,5}$ [h]	1,41	0,28	3,73	0,60	IS
V_d [l]	18,67	1,84	131,72	47,65	IS
V_d [l/kg]	5,03	0,92	31,20	10,31	IS
Cl [l/h]	9,36	1,18	7,51	2,53	NS
Cl [l/h×kg]	2,51	0,43	1,78	0,53	IS

X nie przeprowadzono analizy
IS wynik istotny statystycznie
NS wynik nieistotny statystycznie

Tabela 2. Analiza farmakokinetyczna z oceną statystyczną średnich wartości parametrów uzyskanych po domięśniowym podaniu bupiwakainy w postaci chlorowodoru – BP oraz dyspersji wodnej mikrosfer polimerowych typu I – MSB 1 i typu II – MSB 2 (etap II).

Parametry	BP 1		MSB 1 2		MSB 2 3		Analiza wariancji ANOVA		
	S	SD	S	SD	S	SD	1 Z 2	1 Z 3	2 Z 3
C_{max} [ng/ml]	686,90	182,08	64,16	13,47	31,47	5,69	IS	IS	IS
t_{max} [h]	0,10	0,06	0,24	0,10	0,28	0,12	NS	NS	NS
K_{el} [1/h]	0,5266	0,0849	0,0287	0,0067	0,0244	0,0057	IS	IS	IS
AUC_{0-sh} [ng×h/ml]	402,99	43,55	209,48	125,61	116,72	37,39	NS	IS	IS
AUC_{0-30h} [ng×h/ml]	-	-	350,95	104,39	330,44	56,91	X	X	X
AUC_{tot} [ng×h/ml]	436,03	42,27	640,14	83,63	622,98	155,41	NS	NS	NS
$AUMC_{tot}$ [ng×h ² /ml]	618,30	137,09	68389,17	124867,00	26992,87	9564,13	NS	NS	NS
MRT [h]	1,41	0,21	31,31	10,71	42,67	6,36	IS	IS	IS
$t_{0,5}$ [h]	0,97	0,14	21,70	7,42	29,57	4,41	IS	IS	IS
V_d [l]	16,14	1,92	250,57	99,49	359,68	105,96	IS	IS	IS
V_d [l/kg]	4,75	0,81	70,01	32,53	95,08	32,79	IS	IS	IS
Cl [l/h]	11,56	1,12	4,13	0,61	2,56	0,80	IS	IS	IS
Cl [l/h×kg]	3,40	0,50	1,14	0,28	0,68	0,24	IS	IS	IS

X nie przeprowadzono analizy

IS wynik istotny statystycznie

NS wynik nieistotny statystycznie

ryzyko wystąpienia objawów działania toksycznego oraz wydłużając czas działania farmakologicznego leku.

Uzyskane w badaniach wyniki jednoznacznie potwierdzają ograniczenie dostępności biologicznej BP podanej dożylnie w postaci mikrosfer polimerowych typu I. Wykorzystując ten sposób podania substancji leczniczej uzyskano również modyfikację średnich wartości parametrów farmakokinetycznych określających szybkość procesu jej eliminacji, tj. stałej szybkości eliminacji, biologicznego okresu półtrwania oraz względnego klirensu. Porównanie masy ciała królików nie wykazało istotnych różnic, co pozwala sądzić, że znaczne zwiększenie wartości średniej objętości dystrybucji (V_d) u zwierząt, którym dożylnie podano BP w postaci mikrosfer polimerowych typu I, ma związek z redystrybucją leku oraz wewnątrzcząsteczkową cyrkulacją substancji leczniczej z matrycy polimerowej. Bardziej znacząca modyfikacja procesów kinetycznych substancji czynnej była spodziewana dla pozanaczyniowego (domięśniowego) podania leku w postaci mikrosfer. Porównanie I i II typu badanych mikrosfer z BP, bowiem wskazuje na bardziej ograniczoną biodostępność oraz znaczne spowolnienie absorpcji, gdy lek zostanie podany w postaci iniekcji domięśniowej mikrosfer typu II (MSBP 2). Również wartości parametrów farmakokinetycznych opisujących proces eliminacji substancji leczniczej, uzyskane dla I i II typu badanych mikrosfer, jednoznacznie wskazują na spowolnienie tego procesu po ich domięśniowym zastosowaniu. Potwierdzone tym samym zostały korzystne właściwości wynikające z inkorporowania substancji leczniczej w matrycy polimerowej.

Charakterystyka procesów farmakokinetycznych opisujących substancję leczniczą zastosowaną w postaci iniekcji domięśniowej obydwu typów badanych mikrosfer (MSBP 1 i MSBP 2), nie potwierdziła jednak wyników badań skumulowanego uwalniania *in vitro*. Po domięśniowym zastosowaniu BP w postaci mikrosfer polimerowych typu II spodziewano się szybszego uwolnienia substancji czynnej, skutkującego przyspieszeniem eliminacji leku z ustroju. Tymczasem analiza porównawcza parametrów farmakokinetycznych dokonana między obydwoma typami mikrosfer wykazała znaczne ograniczenie dostępności biologicznej oraz zdecydowane spowolnienie eliminacji substancji leczniczej inkorporowanej w matrycy mikrosfer typu II. Zastosowanie polimeru R104 nie wpłynęło zatem w warunkach *in vivo* na szybsze uwolnienie BP z mikrosfer polimerowych typu II (MSBP 2) i sprawiło, że po 5 godzinach przeprowadzonego doświadczenia dostępność biologiczna badanej substancji leczniczej uległa ograniczeniu do 30%. Analiza dokonanych obserwacji potwierdziła ich dużą zgodność z wynikami doświadczeń, których celem była ocena BP inkorporowanej w matrycy mikrosfer polimerowych zastosowanych celem wykonania blokady splotu ramiennego u owiec. Estebe i wsp. [16] oraz Le Corre i wsp. [29] wykazali, że pomimo istnienia różnic w uwalnianiu *in vitro* pomiędzy różnymi typami badanych mikrosfer z BP, wykonanie badań z użyciem modelu zwierzęcego sprawiło, że takie różnice nie zostały ujawnione.

Ponadto, zastosowanie w niniejszych badaniach BP w postaci iniekcji domięśniowej mikrosfer polimerowych typu I (MSBP 1) pozwoliło wykazać, że u dwóch z badanych zwierząt, którym podano BP w postaci iniekcji domięśniowej mikrosfer typu I, stwierdzono gwałtowne uwolnienie dużych ilości badanej substancji leczniczej. U pierwszego z nich po

Mikrosfery są zaliczane do formacji leku o budowie wielozbiornikowej charakteryzujących się przedłużonym uwalnianiem substancji czynnej. Postacie te są zbudowane z różnego rodzaju matryc, w których substancja lecznicza jest rozpuszczona bądź zawieszona.

24. i 30. godzinach od momentu podania leku oznaczono stężenie substancji leczniczej na poziomie ok. 300–400 ng/ml. U drugiego zwierzęcia dokonano analogicznych obserwacji, oznaczając próbkę krwi pobraną w 30. godzinie, 3. dobie oraz 4. tygodniu prowadzonego doświadczenia. Dokonane spostrzeżenia sprawiły, że zwierzęta te zostały wykluczone z dalszych badań. Po wyeliminowaniu możliwości błędu analitycznego stwierdzono, że wyjaśnienie niekontrolowanego uwolnienia substancji leczniczej wymaga przeanalizowania warunków przechowywania oraz technologicznego procesu otrzymywania badanych mikrosfer. Do uwolnienia substancji leczniczej z matrycy polimerowej dochodzi w efekcie jej powierzchniowej erozji i jednoczesnej dyfuzji leku, toteż przyczyn obserwacji można szukać w nierównomiernym rozmieszczeniu substancji leczniczej w masie matrycy. Powodem, dla którego substancja lecznicza nie uległa równomiernemu rozmieszczeniu w matrycy mogą być nieodpowiednie warunki przechowywania mikrosfer bądź niekontrolowany do końca przebieg procesu inkorporacji. Inną przyczyną dokonanych obserwacji może być aglomeracja cząstek mikrosfer, jednak wówczas należałoby spodziewać się modyfikacji tzw. szybkiej fazy procesu uwalniania substancji leczniczej. Tym samym, w przypadku badanych mikrosfer polimerowych typu I i II nie udało się uzyskać w pełni kontrolowanego uwalniania substancji czynnej.

Badana postać leku wydaje się jednak perspektywicznie przydatna, zarówno w znieczuleniu do zabiegów chirurgicznych jak i analgezji pooperacyjnej. Dzięki modyfikacji parametrów farmakokinetycznych charakteryzujących proces absorpcji i eliminacji substancji leczniczej, możliwe stało się wykazanie zarówno przedłużonego uwalniania jak i działania znieczulającego BP po jej inkorporowaniu w matrycy mikrosfer polimerowych.

W niniejszych badaniach zostało także potwierdzone, pożądane w przebiegu znieczulenia regionalnego, zjawisko zmniejszonej biodostępności. Przeprowadzone badania dowiodły, że powolna absorpcja i niskie stężenia obserwowane dla substancji czynnej podanej w postaci mikrosfer polimerowych może sprzyjać obniżeniu wysokiej toksyczności. Zmniejszenie ryzyka wystąpienia objawów toksycznego działania środka znieczulenia regionalnego jest możliwe, dzięki znacznie wyższej w nowoczesnych nośnikach leku, dawce odpowiedzialnej za ich wystąpienie.

Jakkolwiek udało się potwierdzić korzystny efekt działania BP zastosowanej w postaci mikrosfer polimerowych, to jednak problemy z równomierną inkorporacją substancji leczniczej oraz wynikające z tego faktu niekontrolowane jej uwalnianie z matrycy polimerowej skłaniają do dokładniejszego przyjrzenia się innym metodom zmniejszania toksyczności ogólnoustrojowej środków znieczulenia regionalnego.

Ponadto, potwierdzenie ograniczonego ryzyka wystąpienia objawów działania toksycznego, będącego wynikiem niezamierzonego, donaczyniowego podania środków znieczulenia regionalnego w postaci mikrosfer polimerowych, wymaga przeprowadzenia badań z wykorzystaniem odpowiednich dawek leku oraz poszerzonych o ocenę stopnia blokady czuciowej i motorycznej.

Przyjęto: 2009.01.12 · Zaakceptowano: 2009.01.22

Piśmiennictwo

1. Sweetman S.C.: Martindale. The complete drug reference. Pharmaceutical Press, Chicago 2005, 1367–1372.
2. Aguilar J.L., Montes A., Montero A. i wsp.: Plasma bupivacaine levels after pleural block: The effect of epinephrine after unilateral or bilateral bupivacaine administration. *Reg Anesth*; 1992, 17, 99–100.
3. Dollery C.: *Therapeutic Drugs*. Churchill Livingstone, 1999, B99-B102.
4. Aitkenhead A.R., Smith G.: *Podręcznik anestezjologii*. Oficyna Wydawnicza Atena, Poznań, 1995, 139–255.
5. Kamiński B., Kübler A.: *Anestezjologia i intensywna terapia*. Podręcznik dla studentów medycyny. PZWL, Warszawa, 2002, 60–199.
6. Garstka J.: *Znieczulenie przewodowe*. PZWL, Warszawa, 1992, 17–86.
7. Przeklasa-Muszyńska A., Dobrogowski J.: *Powikłania znieczulenia miejscowego*. Andres J.(red.): *Neurologia, znieczulenie regionalne i terapia bólu*. Ośrodek Regionalny FEEA w Krakowie, Kraków, 2005, 129–148.
8. Nancarrow C., Ruten A.J., Runciman W.B. i wsp.: Myocardial and cerebral drug concentrations and the mechanism of death after fatal intravenous doses of lidocaine, bupivacaine and ropivacaine in the sheep. *Anesth Analg* 1989; 69: 276–283.
9. Boban M., Stowe D.F., Gross G.J. i wsp.: Potassium channel openers attenuate atrioventricular block by bupivacaine in isolated hearts. *Anesth Analg*, 1993, 76: 1259–1265.
10. Janicki S., Sznitowska M.: *Kierunki doskonalenia postaci leku*, *Farm. Pol.* 1998, 54, 110–120.
11. Janicki S.: *Urzeczywistnienie idei leku wielokompartamentowego*, *Farm. Pol.* 1999, 55, 139–148.
12. Malinovsky J.M., Le Corre P., Meunier J.F. i wsp.: A dose-response study of epidural liposomal bupivacaine in rabbits. *J Controlled Release* 1999, 60, 111–119.
13. Masters D.B., Berde C.B., Dutta S. i wsp.: Sustained local anesthetic release from biodegradable polymer matrices: A potential method for prolonged regional anesthesia. *Pharmacol Res*, 1993, 10, 1527–32.
14. Freville J.C., Dollo G., Le Corre P. i wsp.: Controlled systemic absorption and increased anesthetic effect of bupivacaine following epidural administration of bupivacaine following epidural administration of bupivacaine – hydroxypropyl–beta-cyclodextrin complex. *Pharmacol Res*, 1996, 13, 1576–80.
15. Dollo G., Le Corre P., Chevanne F. i wsp.: Bupivacaine containing dry emulsion can prolong epidural anesthetic effects in rabbits. *Eur J Pharm Sci*, 2004, 22, 63–70.
16. Estebe J.P., Le Corre P., Du Plessis L. i wsp.: The pharmacokinetics and pharmacodynamics of bupivacaine-loaded microspheres on a brachial plexus block model in sheep. *Anesth Analg*, 2001, 93, 447–55.
17. Halkiewicz A., Janicki S.: *Mikrosfery jako postać leku do podawania pozajelitowego*, *Farm. Pol.* 1995, 51, 836–846.
18. Sznitowska M.: *Technologia mikrocząstek i nanocząstek jako nośników leku*, *Farm. Pol.* 2001, 57, 962–969.
19. Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M.: *Farmacja stosowana*. Podręcznik dla studentów farmacji. PZWL, Warszawa 2002, 231–232.
20. Suffritti G.: *Toxicological evaluation of the incorporation of polymers and copolymers based*

Przeprowadzone badania dowiodły, że powolna absorpcja i niskie stężenia obserwowane dla substancji czynnej podanej w postaci mikrosfer polimerowych może sprzyjać obniżeniu wysokiej toksyczności. Zmniejszenie ryzyka wystąpienia objawów toksycznego działania środka znieczulenia regionalnego jest możliwe, dzięki znacznie wyższej w nowoczesnych nośnikach leku, dawce odpowiedzialnej za ich wystąpienie.

- on L, D- and D,L-lactide and glycolide. March 1997. www.ghimas.it/dentale/documenti/inglese/Toxicological%20Evaluation.PDF 06.09.2006
21. Nakamura T., Hitomi S., Watanabe S., Shimiz Y., Hyon S.H., Ikada Y.: Bioabsorption of polylactides with different molecular properties. *J. Biomed. Mater. Res.* 1989, 23, 1115–1130.
 22. Yamaguchi K., Anderson J.M., Feijen J., Heller J.: In vivo biocompatibility studies of Medisorb 63/35 D,L-lactide/glycolide copolymer microspheres. *J. Controlled Release* 1993, 24, 81–93.
 23. Curley J., Castillo J.B.A., Hotz J., Uezono M., Hernandez S.: Prolonged regional nerve blockade: Injectable biodegradable bupivacaine/polyester microspheres. *Anesthesiology* 1996, 84, 1401–1410.
 24. D'Souza S.S., Faraj J.A., DeLuca P.P.: A model-dependent approach to correlate accelerated with real time release from biodegradable microspheres. *AAPS PharmSciTech* 2005, 6, E553–E564.
 25. Ratajczak M.: Technologia otrzymywania mikrosfer z kopolimerów kwasu mlekowego i glikolowego oraz bupiwakainy. Praca magisterska. Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Poznaniu/Rennes 2002.
 26. Estebe J.P.; Le Corre P.; Du Plessis L., Chevanne F., Cathelineau G., Le Verge R., Ecoffey C.: The pharmacokinetics and pharmacodynamics of bupivacaine-loaded microspheres on a brachial plexus block model in sheep, *Anesth. Analg.* 2001, 93, 447–455.
 27. Lorec A.M., Bruguerolle B., Attolini L., Roucoules X.: Rapid simultaneous determination of lidocaine, bupivacaine and their two main metabolites using capillary gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detector, *Ther Drug Monit.* 1994, 16, 592–595.
 28. Tanaka E, Nakamura T, Inomata S, Honda K.: Simultaneous determination of three local anesthetic drugs from the pipercolonylidide group in human serum by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006, 834, 213–216.
 29. Le Corre P., Estebe J.P., Clement R., Du Plessis L., Chevanne F., Ecoffey C., Le Verge R.: Spray-dried bupivacaine-loaded microspheres: *in vitro* evaluation and biopharmaceutics of bupivacaine following brachial plexus administration in sheep, *Int. J. Pharm.* 2002, 238: 191–203.