

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 615.032

©Коллектив авторов

СИСТЕМА ТРАНСПОРТА НА ОСНОВЕ ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ РИФАМПИЦИНА

*М.А. Санжаков, В.Н. Прозоровский, О.М. Ипатова, Е.Г. Тихонова,
Н.В. Медведева, Т.И. Торховская**

Федеральное Государственное Бюджетное учреждение
“Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича” Российской Академии Медицинских Наук,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; тел.: (499) 246-40-08, (499) 246-43-56;
эл. почта: torti@mail.ru

Низкая биодоступность рифампицина – одного из основных противотуберкулёзных препаратов, стимулирует поиски его новых оптимизированных систем, в частности с использованием нанотехнологий. В данной работе показана возможность встраивания противотуберкулёзного препарата рифампицина в наночастицы из растительного фосфатидилхолина с диаметром 20-30 нм. Степень встраивания возрастала более чем вдвое при добавлении в фосфолипидную наносистему олеата натрия. После перорального введения крысам в дозе 6 мг/кг максимальная концентрация рифампицина в плазме, измеренная методом LC/MS, достигалась через час и составляла для свободного рифампицина 0,5 мкг/мл, а для встроенного в фосфолипидно-олеатные наночастицы – в среднем 4,2 мкг/мл, сохраняясь в течение двух часов эксперимента. Высокая биодоступность рифампицина в фосфолипидной транспортной системе с олеатом натрия указывает на возможную перспективность её использования.

Ключевые слова: лечение туберкулёза, рифампицин, наночастицы, олеат, фосфолипиды, биодоступность

ВВЕДЕНИЕ. Повышение эффективности лекарственных препаратов путём встраивания лекарственных субстанций в различные системы доставки является одним из перспективных направлений современной фармацевтики. Наиболее продвинутой в этом отношении областью является разработка противоопухолевых препаратов, для которых такие лекарственные формы, в частности, на основе липосом, находят широкое практическое применение [1]. Для противотуберкулёзных препаратов на фармацевтическом рынке пока ещё нет форм с современными системами доставки, хотя активные разработки в этом направлении проводятся [2]. Их актуальность обусловлена возросшей частотой заболеваемости, а также существующими проблемами и трудностями лечения туберкулёза. В первую очередь, это необходимость длительных курсов лечения для полной ликвидации *M. tuberculosis*, особенно в случаях резистентных форм, что вызывает побочные эффекты лекарств – в основном нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта

* - адресат для переписки

и гепатотоксичность [3]. Для одного из наиболее эффективных противотуберкулёзных препаратов – рифампицина, обязательного компонента всех терапевтических схем лечения [3] – проблемой является также его переменная биодоступность при пероральном введении, что обусловлено низкой и зависящей от pH водорастворимостью и частичным разложением в кислой среде желудка (гидролизом до нерастворимого производного хинона или деацетилированной формы) [4].

Для защиты рифампицина от действия среды предлагалось использование полимерных или желатиновых микрокапсул, пористых микросфер [5-7]. Существенное внимание уделяется разработке различных систем транспорта рифампицина, в том числе на основе наночастиц, помогающих преодолеть его низкую растворимость. Имеются сообщения о включении рифампицина (иногда в комплексе с другими противотуберкулёзными препаратами первого ряда) в липосомы, наноземulsionи, ниосомы, полимерные наночастицы и мицеллы [2, 4, 8, 9]. Большинство разрабатываемых транспортных систем с встроенным рифампицином предназначено для ингаляционного или инъекционного введения. [10, 11]. Для более удобного, перорального применения предлагались в основном полимерные наночастицы на основе полилактидглюкозида: они способствовали пролонгации пребывания лекарства в крови и органах экспериментальных животных и повышали его антиотуберкулёзное действие [12]. Аналогичные эффекты показаны и при включении рифампицина (с двумя другими лекарствами) в твёрдые липидные наночастицы [13]. Однако отмечается, что “на сегодняшний день нет лекарственной формы рифампицина, которая могла бы существенно повысить его биодоступность при пероральном введении” [3].

Нами была разработана и запатентована новая форма транспорта лекарств в виде наночастиц на основе соевого фосфатидилхолина [14], а также её модификация с добавлением олеата натрия [15], с диаметром частиц менее 30 нм, и показана возможность встраивания в наночастицы ряда лекарств, существенно повышающего их биодоступность.

Целью настоящей работы было выяснение возможности встраивания рифампицина в такие системы, а также исследование влияния встраивания на биодоступность рифампицина при пероральном введении крысам.

МЕТОДИКА. Использовали соевый фосфолипид фирмы Lipoid GmbH (Германия) Lipoid S100 с содержанием фосфатидилхолина 94-96%, моногидрат мальтозы (MERCK, Германия), натриевую соль олеиновой кислоты (“Aldrich”, Германия), лекарственную субстанцию рифампицина (“Sandoz Pvt Ltd”, Индия). Для встраивания рифампицина использовали разработанную нанотосфолипидную систему транспорта с олеатом натрия, оригинальная технология получения которой подробно изложена в заявке на изобретение [15]. К грубой водной эмульсии соевого фосфатидилхолина (25 мг/мл) в 10% растворе мальтозы добавляли лекарственную субстанцию рифампицина (до концентрации 2,5 мг/мл) и натриевую соль олеиновой кислоты (до 2 мг/мл). Эмульсию перемешивали, нагревали до 42-45°C и подвергали нескольким (5-7) циклам гомогенизации с использованием микрофлюидайзера M110EH30K (“Microfluidics”, США) при давлении 1000 атм и температуре 40-45°C. Доводили pH полученной наноземulsionи до нейтральных значений (1 М раствором HCl), и фильтровали на установке “Millipore Corporation” (США). Размер частиц определяли с помощью лазерного корреляционного спектрометра N5 Submicron particle analyzer (“Beckman-Coulter Inc.”, США). Препарат разливали в стерильные флаконы

по 10 мл и лиофилизировали с помощью сублимационной сушилки Virtis AdVantage XL (США) [15]. На первом этапе работы в сравнительных экспериментах по встраиванию рифампицина использовали фосфолипидную композицию, приготовленную по той же схеме, но без добавления олеата натрия, подробно описанную в заявке на изобретение [14]. Концентрацию рифампицина в препаратах определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Милихром А-02 (“Эконова”, Россия). Для этого аликвоту наноэмульсии разбавляли в 20 раз метанолом, и 10 мкл полученного раствора наносили на колонку 2×75 (Prontosil 120-5 C18, 5 мкм). Элюцию проводили смесью “ацетонитрил / 0,1% трифторуксусная кислота” с градиентом ацетонитрила 45-80%, регистрируя элюцию рифампицина по поглощению при 238 нм.

Оценку биодоступности рифампицина в полученной наноконпозиции в сравнении со свободной формой лекарства проводили на белых беспородных крысах Wistar. Лиофилизированный препарат подвергали регидратации и вводили перорально в дозе 6 мг/кг. Параллельно группа животных получала свободный рифампицин в той же дозе. Через заданные промежутки времени (до 2-х часов) отбирали образцы крови из хвостовой вены, с использованием Трилона Б в качестве антикоагулянта. Плазму отделяли центрифугированием, в течение 20 мин при 3000 g и температуре 4°C, рифампицин экстрагировали 9-кратным объёмом метанола и определяли его содержание методом LC/MS на хроматографе Agilent 1200 Series (“Agilent Technologies”, США) с масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS. Использовали колонку Zorbax 300SB-C3 (4,6×150 мм, 5 мкм), проводя элюцию, как описано выше для ВЭЖХ при приготовлении препарата. Концентрацию рифампицина рассчитывали в мкг на 1 мл плазмы. В каждой группе использовали по 3 животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

1. *Встраивание рифампицина в фосфолипидные наночастицы; влияние добавления олеата.* На первом этапе исследований был проведён выбор оптимальной фосфолипидной транспортной наносистемы, позволяющей добиться наибольшего встраивания рифампицина в фосфолипидные наночастицы. Анализ литературных данных по включению рифампицина в другие фосфолипидные частицы (липосомы) показывает, что в основном использовали не чистый фосфатидилхолин, а добавляли липиды с катионными или анионными группами [16, 17]. В последнем случае методом ЯМР было показано встраивание рифампицина в фосфолипидный бислой [17]. Возможно, что встраиванию рифампицина способствует его солубилизация за счёт присутствия заряженных групп. Нами для этой цели была выбрана олеиновая кислота, и было исследовано включение рифампицина в фосфолипидные наночастицы, содержащие олеат (в соотношении 1:12,5) [15]. В качестве препарата сравнения использовали в такую же наносистему из чистого фосфатидилхолина без добавления олеата [14].

Как видно из таблицы, в случае использования в составе системы олеата натрия включение лекарства оказалось более чем вдвое выше, а размеры образующихся наночастиц меньше. То есть, в случае фосфолипидной наносистемы с включением олеата [15] соотношение лекарство/липид более чем вдвое выше, чем для системы на основе только фосфатидилхолина [14]. В ряде работ отмечались и другие преимущества включения олеатного аниона в фосфолипидные дисперсии как фактора, повышающего их стабильность [18] и защищающего фосфолипиды от окисления [19]. Фосфолипидная система с добавлением олеата натрия [15] использовалась нами для включения рифампицина в последующих экспериментах *in vivo*.

РИФАМПИЦИН В ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

Таблица. Степень включения рифампицина в фосфолипидную наносистему из чистого фосфатидилхолина или из фосфатидилхолина с добавлением олеата натрия

Компоненты наносистемы	Параметры характеристики наносистемы				
	Включение рифампицина				Размер частиц, нм
	Концентрация рифампицина, мг/мл		Процент включения (%)	Отношение «лекарство/липид»	
	Исходная	Включено в наноэмульсию			
Фосфатидил-холин	2,5	0,99	39,6	1:25,2	65,7±4,1
Фосфатидил-холин+олеат натрия	2,5	2,38	95,2	1:11,3	24,6±5,7

2. Биодоступность рифампицина, включённого в фосфолипидно-олеатные наночастицы. Для выяснения влияния встраивания рифампицина в фосфолипидно-олеатную наносистему на его биодоступность определяли его концентрацию в плазме крови крыс через 15, 30, 60 и 120 мин после перорального введения его свободной формы или включённой в данную нанофосфолипидную систему формы (рисунок).

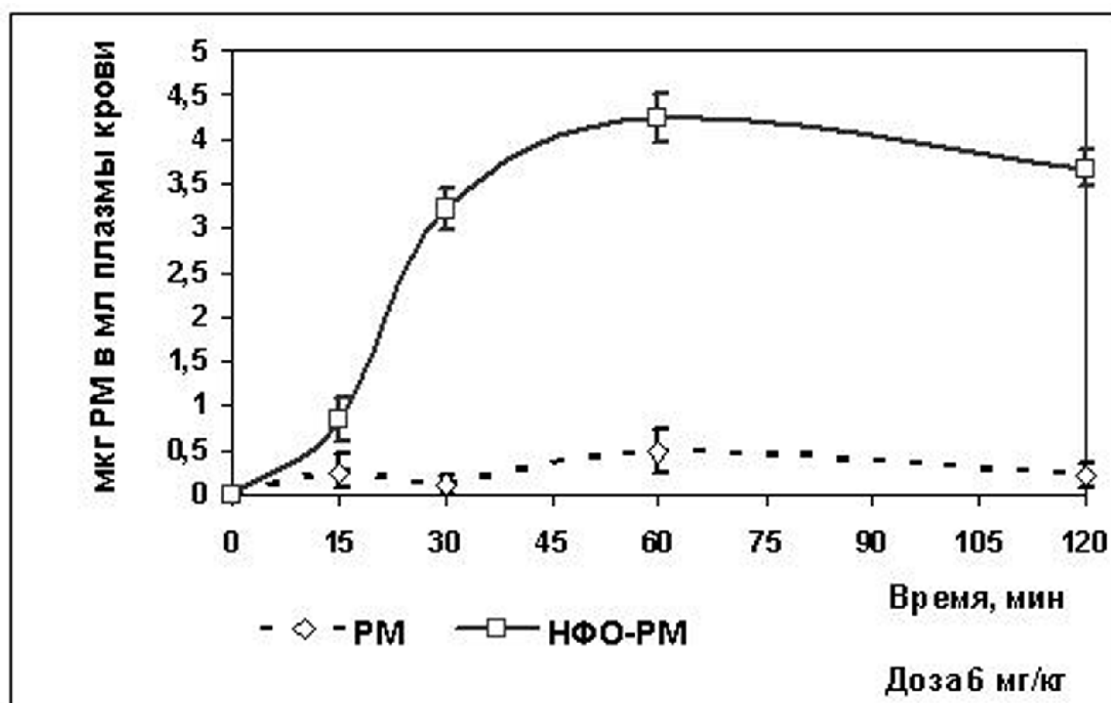


Рисунок.

Концентрация рифампицина в плазме крови у крыс после перорального введения его свободной формы или встроеного в фосфолипид-олеатные наночастицы (Сокращения: РМ - свободный рифампицин; НФО-РМ - рифампицин в фосфолипидно-олеатных наночастицах).

Как видно из рисунка, после введения свободного рифампицина его концентрация в плазме медленно возрастала, достигая через час своего максимума (~0,5 мкг/мл), с последующим постепенным снижением. В случае нанофосфолипидной формы такая концентрации достигалась уже через 15 мин и продолжала далее возрастать, достигая через час значений (в среднем 4,2 мкг/мл), превышающих более чем в 8 раз таковые для свободного рифампицина, и сохраняясь в пределах 2 ч. Полученные данные согласуются с результатами экспериментов Pandey с соавт. для рифампицина, встроенного в полимерные или твёрдые липидные наночастицы, также показавших значительное повышение его концентрации в плазме после перорального введения мышам по сравнению со свободным лекарством [12, 13].

Таким образом, биодоступность рифампицина, встроенного в фосфолипидную наносистему, содержащую олеат натрия, оказалась практически на порядок выше, чем для свободного лекарства. Это свидетельствует о повышении кишечной абсорбции лекарства, обусловленной, по всей вероятности, сочетанием двух факторов – наноразмером несущих лекарство частиц [20], а также присутствием олеата [21]. Следствием повышения биодоступности должно быть повышение и противотуберкулёзного действия рифампицина, позволяющее снижать вводимые дозы, ослабляя тем самым побочные эффекты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ranganathan R., Madanmohan S., Kesavan A., Baskar G., Krishnamoorthy Y.R., Santosham R., Ponraju D., Rayala S.K., Venkatraman G. (2012) *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 1043-1060.
2. Dube D., Agrawal G.P., Vyas S.P. (2012) *Drug Discov Today*, **17**(13-14), 760-773.
3. du Toit L.C., Pillay V., Danckwerts M.P. (2006) *Respir Res.*, **7**(1), 118.
4. Sosnik A., Carcaboso A.M., Glisoni R.J., Moretton M.A., Chiappetta D.A. (2010) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**(4-5), 547-559.
5. Sarfaraz M.D., Hiremath D., Chowdary K.P.R. (2010) *Indian J. Pharm. Sci.*, **72**(1), 101-105.
6. Gohel M., Sarvaiya K.G. (2007) *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **8**(3), E 68.
7. Bhise S.B., More A.B., Rajkumar M. (2010) *Sci. Pharm.*, **78**, 291-302.
8. Gupta S., Kumar P., Gupta M.K., Vyas S. (2012) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **29**(4), 299-353.
9. Shegokar R., Al Shaal L., Mitri K. (2011) *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **14**(1), 100-116.
10. Willis L., Hayes D.Jr., Mansour H.M. (2012) *Lung*, **190**(3), 251-262.
11. Ahmed M., Ramadan W., Rambhu D., Shakeel F. (2008) *Pharmazie*, **63**(11), 806-811.
12. Pandey R., Zahoor A., Sharma S., Khuller G.K. (2003) *Tuberculosis (Edinb)*, **83**(6), 373-378.
13. Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. (2005) *Tuberculosis (Edinb.)*, **85**(5-6), 415-420.
14. Арчаков А.И., Гусева М.К., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Тихонова Е.Г., Медведева Н.В., Лисица А.В., Прозоровский В.Н., Стрекалова О.С., Широнин А.В. (2010) Патент № 2391966 по заявке № 2009104784. Бюлл. изобретений №17.

РИФАМПИЦИН В ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

15. *Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Санжаков М.А., Тихонова Е.Г., Попков И.А., Стрекалова О.С., Широнин А.В.* (2012) Патент № 2463056 по заявке № 2011114573. Бюлл. изобретений № 28.
16. *Wasserman M., Beltrán R.M., Quintana F.O., Mendoza P.M., Orozco L.C., Rodriguez G.* (1986) *Tubercle*, **67**(2), 83-90.
17. *Минина А.С., Сорокоумова Г.М., Селишева А.А., Маликова Н.М., Калашиникова Т.Ю., Швец В.И.* (2004) *Биофизика*, **49**, 674-679.
18. *Werling J., Graham S., Owen H., Nair L., Gonyon T., Carter P.W.* (2008) *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **69**(3), 1104-1113.
19. *Lee C., Barnett J., Reaven P.D.* (1998) *J. Lipid Res.*, **39**, 1239-1247.
20. *Roger E., Lagarce F., Garcion E., Benoit J.P.* (2010) *Nanomedicine (Lond)*, **5**, 287-306.
21. *Cano-Cebrián M.J., Zornoza T., Granero L., Polache A.* (2005) *Curr. Drug Deliv.*, **2**, 9-22.

Поступила: 06. 03. 2013.

DRUG DELIVERY SYSTEM ON THE BASE OF PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES FOR RIFAMPICIN

*M.A. Sanzhakov, V.N. Prozorovskyi, O.M. Ipatova, E.G. Tikhonova,
N.V. Medvedeva, T.I. Torkhovskaya*

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, Russia 119121;
tel.: 8-499-248-40-08, 8-499-43-56; e-mail: torti@mail.ru

Low bioavailability of rifampicin, one of the main antituberculous drug, stimulates searches of its new optimized formulations. The present study has shown possibility of rifampicin embedding into nanoparticles from plant phosphatidylcholine (diameter of 20-30 nm). Addition of sodium oleate to the phospholipid system caused a 2-fold increase of the percent of rifampicin incorporation. After oral administration to rats, the maximal drug observed in plasma one hour after was 0.5 and 4.2 mkg/ml for free rifampicin for rifampicin in phospholipids-oleate nanoparticles, respectively. These levels were maintained for more than two hours of the experiment. High rifampicin bioavailability in the oleate containing phospholipid nanosystem suggests prospectivity of its pharmaceutical elaboration.

Key words: tuberculosis treatment, rifampicin, nanoparticles, phospholipids, oleate, bioavailability.

