Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 3, с. 348-353.

УДК 615.032

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИФАМПИЦИНА, ВКЛЮЧЕННОГО В ФОСФОЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ, С ЛИПОПРОТЕИНАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

М.А. Санжаков, О.М. Ипатова, В.Н. Прозоровский, 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

В Институте биомедицинской химии разработана и запатентована лекарственная композиция противотуберкулёзного препарата рифампицина, встроенного в наночастицы с диаметром 20-30 нм из соевого фосфатидилхолина с добавлением олеата натрия. Исходя из данных литературы об активации на поверхности макрофагов рецепторов к липопротеинам низкой плотности (ЛНП) при инфицировании *M. tuberculosis* и воспалении, в данной работе исследовали распределение рифампицина по компонентам плазмы крови *in vitro* при инкубации как со свободным рифампицином, так и в составе разработанной нанокомпозиции. После инкубации в течение 30 мин плазму крови разделяли ультрацентрифугированием, и в полученных фракциях липопротеинов методом ВЭЖХ определяли содержание рифампицина. Получено, что после инкубации с плазмой свободного рифампицина он обнаруживался в основном в белковой фракции и в липопротеинах высокой плотности (ЛВП) (41% и 38%, соответственно), а при инкубации рифампицина в наночастицах доля лекарства в этих фракциях снижалась в 2-3 раза, и оно присутствовало преимущественно в ЛНП (60% по сравнению с 21% для свободного рифампицина). Повышенная ассоциация рифампицина с ЛНП рассматривается как фактор повышения его доставки в макрофаги, а следовательно, и противотуберкулёзной активности.

Ключевые слова: рифампицин, лечение туберкулёза, фосфолипидные наночастицы, липопротеины низкой плотности, макрофаги.

ВВЕДЕНИЕ. Повышение заболеваемости туберкулёзом в последнее десятилетие стимулировало поиски эффективных средств его лечения, что обусловлено также недостатками имеющихся противотуберкулёзных препаратов. Особенно это относится к рифампицину – неотъемлемому компоненту всех современных схем лечения [1]. Для этого макроциклического антибиотика характерна гепатотоксичность, наряду с низкой биодоступностью [1]. Поэтому, параллельно с разработкой новых лекарств, проводятся поиски

* - адресат для переписки

новых, более эффективных, форм рифампицина, в частности, разрабатываются системы доставки, в основном с использованием различного вида наночастиц. При этих разработках внимание ряда авторов было направлено не только на преодоление упомянутых недостатков этого лекарства, но и на поиск путей повышения его проникновения в альвеолярные макрофаги – преимущественное место локализации *M. tuberculosis* [2]. Использовались различные подходы, основанные на возможностях взаимодействия наночастиц с макрофагами [3, 4]. Так, поверхности наночастиц придавали отрицательный заряд путём включения фосфатидилсерина или дицетилфосфата [5], добавляли соединения, содержащие маннозу или специфический лиганд макрофагов – стеароил-амилопектин [2].

Другим способом повышения афинности к макрофагам для наночастиц с включённым лекарством могло бы быть использование рецепторов к плазменным липопротеинам на клеточной поверхности. Такой подход описан в литературе для повышения доставки некоторых лекарств, в частности, противоопухолевых – за счёт их связывания с липопротеинами низкой плотности (ЛНП) [6-8]. Это может быть в принципе применено и для противотуберкулёзных препаратов, в частности, для рифампицина. Показано, что в условиях воспаления и при инфицировании *M. tuberculosis* в макрофагах активируются ЛНП-рецепторы [9, 10]. Поэтому ассоциация рифампицина с ЛНП могла бы способствовать его доставке в макрофаги и действию на персистирующие в них бактерии [11].

Нами была разработана и запатентована лекарственная композиция рифампицина, встроенного в наночастицы с диаметром 20-30 нм, из соевого фосфатидилхолина с добавлением олеата натрия [12]. Показано, что при пероральном введении животным она повышает биодоступность и противотуберкулёзное действие рифампицина [12, 13]. Исходя из данных об использовании рифампицина при различных путях введения [1], предполагается возможность использования разработанной наносистемы и для инъекционного введения.

В настоящей работе исследовали влияние включения рифампицина в данную наносистему на его распределение в плазме между различными классами липопротеинов и белковой фракцией при инкубации *in vitro*, с целью потенциальной оценки возможности его транспорта в альвеолярные макрофаги [11], наряду с обусловленным олеатом отрицательным зарядом наночастиц [13].

МЕТОДИКА. Нанокомпозицию рифампицина, встроенного в фосфолипидно-олеатные наночастицы, получали, как описано ранее [12], путём гомогенизации эмульсии, содержащей фосфатидилхолин (25 мг/мл), рифампицин и олеат натрия (по 2 мг/мл), в 10% растворе мальтозы, с помощью микрофлюидайзера M110EH30K (“Microfluidics”, США). После фильтрации на установке “Millipore Corporation” (США) продукт высушивали в лиофильной сушке Virtis AdVantage XL (“SP Scientific”, США) и перед использованием лиофилизат регидратировали. Характеристику полученной нанокомпозиции проводили как описано ранее [12]: диаметр частиц, измеренный с помощью лазерного корреляционного спектрометра Submicron particle analyzer (“Beckman-Coulter Inc.”, США), был 26-30 нм; процент включения рифампицина, определяемый с использованием ВЭЖХ и ультрафильтрации, составлял более 90% [12].

Для изучения распределения рифампицина по компонентам плазмы цельную донорскую кровь человека инкубировали в присутствии полученной нанокомпозиции при концентрации рифампицина 300 мкг/мл в течение 30 мин при 37°С. Параллельно инкубировали образец крови с тем же количеством свободного рифампицина, добавляя его в виде метанольного раствора соответствующей концентрации в объёме 1% от общего объёма инкубационной смеси. Для нивелирования возможного влияния метанола добавляли равное его количество (1% по объёму) и при инкубации крови с нанокомпозицией рифампицина.

После инкубации отделяли плазму (центрифугированием 20 мин при 4°С при 3000 g) и фракционировали в градиенте плотности NaBr [14] на ультрацентрифуге L8-M (“Beckman Instrument, Inc.”). В полученных фракциях липопротеинов – очень низкой (ЛОНП), низкой (ЛНП) и высокой плотности (ЛВП) – и во фракции белков плазмы проводили экстракцию рифампицина 9-кратным объёмом метанола и определяли его концентрацию методом ВЭЖХ на хроматографе “Agilent Technologies” (1100 Series) (США) со спектрофотометрическим детектором G1315B. Использовали колонку Eclipse XDB-C18 размером 4,6×150 мм, с дисперсностью сорбента 5 мкм. Рифампицин элюировали смесью “ацетонитрил / 0,1% трифторуксусная кислота” в соотношении 65:35 в течение 8 мин при скорости потока элюента 0,5 мл/мин. Сигнал, соответствующий рифампицину, детектировали при 254 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке представлено распределение рифампицина по компонентам плазмы крови при его инкубации *in vitro* с плазмой в свободной форме или в составе фосфолипидно-олеатной транспортной наносистемы (ФОТН). Как видно из рисунка, встраивание рифампицина в фосфолипидно-олеатные наночастицы существенно влияет на его распределение по компонентам плазмы. Если свободный рифампицин в основном присутствует в белковой фракцией или ЛВП (41% и 38%, соответственно), то при инкубации в составе наночастиц доля лекарства в этих фракциях снижается в 2-3 раза, и он обнаруживается преимущественно в ЛНП (60% по сравнению с 21% для свободного рифампицина). Сходные данные были получены нами ранее для противовоспалительного лекарства индометацина, при встраивании его в фосфолипидные наночастицы [15]. Снижение доли лекарства, ассоциированного с белками плазмы (альбумином или/и альфа-1-кислым гликопротеином), с соответствующим перераспределением к ЛВП или ЛНП, описано для липосомальных форм ряда лекарств по сравнению со свободными [16, 17], что связывают с функционированием липид-переносящих белков плазмы [6, 17]. В частности, полагают возможность совместного транспорта с помощью этих белков липофильного лекарства вместе с фосфолипидами из частицы-переносчика к ЛВП или/и вместе с этерифицированным холестерином из ЛВП к ЛОНП и ЛНП [17]. В большинстве случаев такое перераспределение лекарств, например, противоопухолевых и противовоспалительных, сопровождается повышением их фармакологической эффективности за счёт появления возможности рецепторного взаимодействия с клеткой-мишенью [7, 16]. Для рифампицина имеются лишь данные о его ассоциации с альфа-1-кислым гликопротеином, причём показано, что у больных туберкулёзом она может увеличиться за счёт гликозилирования белка [18]. Полагают также, что снижение связывания лекарства с белками плазмы делает его более доступным для фармакологического действия [19]. В этом отношении полученные нами данные о снижении связывания рифампицина с белками при его включении в фосфолипидные наночастицы (рисунок) могут рассматриваться как положительный факт в плане повышения эффективности лекарства. Существенным фактором для этого является и большее сродство рифампицина к ЛНП (рисунок). В свете данных о поглощении макрофагами ЛНП путём рецепторного взаимодействия и активации этих рецепторов при воспалительных процессах [9, 10], связывание рифампицина с ЛНП создаёт возможность использования этих естественных путей транспорта для доставки лекарства в поражённые микобактериями макрофаги [11]. Следовательно, разработанная транспортная наносистема в кровяном русле может обеспечить преимущественное связывание рифампицина с ЛНП, повышая (по сравнению со свободным рифампицином) его доставку в макрофаги, в дополнении к отрицательному заряду поверхности наночастиц [3-5].

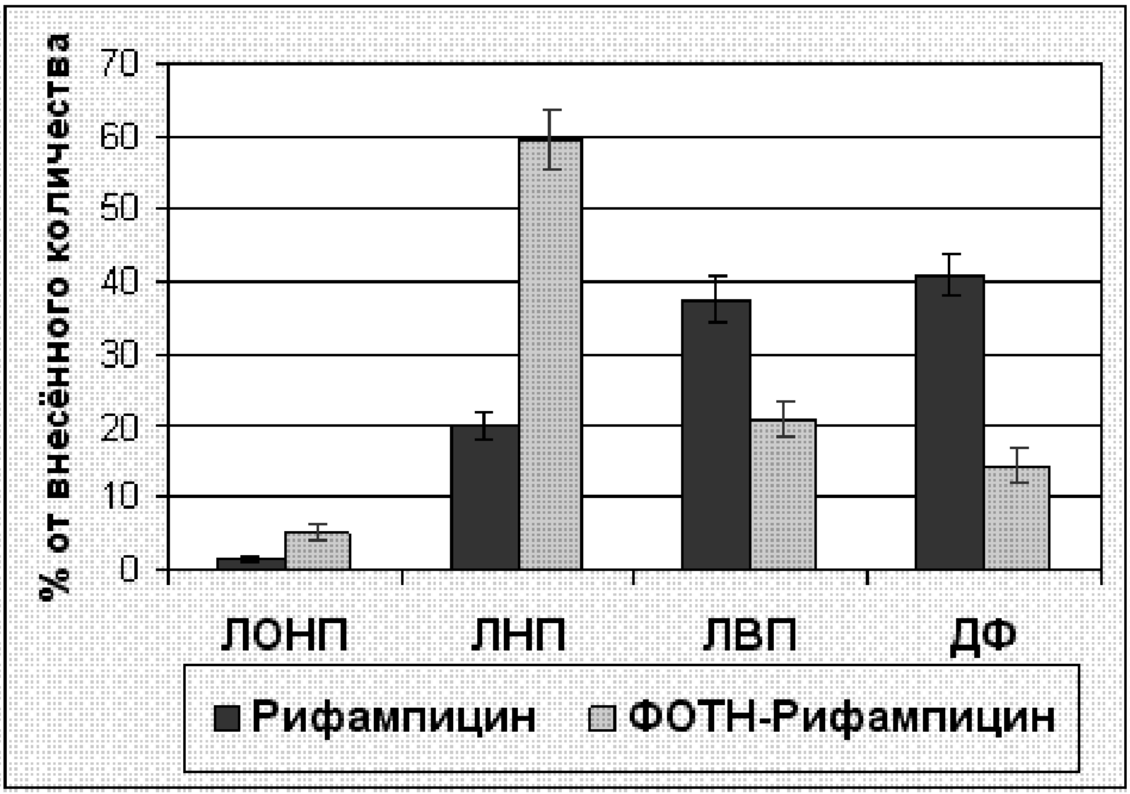

Рисунок.
Распределение по компонентам плазмы крови рифампицина в составе наночастиц по сравнению со свободным рифампицином.
Сокращения: ЛОНП, ЛНП и ЛВП – соответственно, липопротеины очень низкой, низкой и высокой плотности; ДФ – донная (белковая) фракция плазмы; ФОТН - фосфолипидно-олеатная транспортная наносистема.

Полученные результаты указывает на ещё один фактор, обеспечивающий возможность терапевтического преимущества инъекционной формы рифампицина в фосфолипидной наносистеме по сравнению с соответствующей свободной формой лекарства, наряду с показанным ранее снижением токсичности этого противотуберкулёзного препарата [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. *du Toit L.C., Pillay V., Danckwerts M.P.* (2006) Respir Res., **7**, 118
2. *Vyas S.P., Kannan M.E., Jain S., Mishra V., Singh P*. (2004) Int. J. Pharm., **269**, 37-49.
3. *D'Addio S.M., Baldassano S., Shi L., Cheung L., Adamson D.H., Bruzek M., Anthony J.E., Laskin D.L., Sinko P.J., Prud'homme R.K.* (2013) J. Control Release, **168**, 41-49.
4. *Chono S., Tanino T., Seki T., Morimoto K.* (2007) J. Pharm. Pharmacol., **59**, 75-80.
5. *Mehta S.K., Jindal N., Kaur G.* (2011) Colloids Surf. B. Biointerfaces, **87**, 173-179.
6. *Торховская Т.И., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Иванов В.С., Иванова Л.И.* (2010) Вестник РАМН, №5, 420-425.
7. *Masquelier M., Vitols S., Pålsson M., Mårs U., Larsson B.S., Peterson C.O.* (2000) J. Drug Target., **8**, 155-164.
8. *Зыкова М.А., Ипатова О.М., Прозоровский В.Н., Медведева Н.В., Воскресенская А.А., Захарова Т.С., Торховская Т.И.* (2011) Биомед. химия, **57**, 174-179.
9. *Palanisamy G.S., Kirk N.M., Ackart D.F., Obregón-Henao A., Shanley C.A., Orme I.M., Basaraba R.J.* (2012) PLoS One, **7**(3), e34148.
10. *Ye Q., Chen Y., Lei H., Liu Q., Moorhead J.F., Varghese Z., Ruan X.Z.* (2009) Inflamm. Res., **58**(11), 809-818.
11. *Mankertz J., Nundel M., von Bayer H., Riedel E*. (1997) Biochem. Biophys. Res. Com., **204**(1), 112-115.
12. *Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н. Санжаков М.А., Тихонова Е.Г., Дружиловская О.С., Минаев С.А., Кюркчан П.А.* (2011) Противотуберкулезная композиция и способ её получения. Патент RU 2472512.
13. *Санжаков М.А., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Ипатова О.М.* (2012) Материалы Московской международной научно-практической конференции “Фармацевтические и биомедицинские технологии”, Москва, с. 256-257.
14. *Тертов В.В.* (1999) Ангиол. сосуд. хир., **5**(прил.), 218-239.
15. *Широнин А.В., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г., Торховская Т.И.* (2012) Эфферент. физ-хим. мед., **1**, 21-24.
16. *Dutta R.C.* (2007) Curr. Pharm. Des., **13**(7), 761-769.
17. *Wasan K.M., Morton R.E., Roswenblum M.G., Lopez-Berstein G*. (1994) J. Pharm., **83**, 1006-1010.
18. *Jonson D.A., Smith K.D.* (2006) Biomed. Chromatogr., **20**(6-7), 551-560.
19. *Tesseromatis C., Alevizou A.* (2008) Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., **33**(4), 225-230.

Поступила: 22. 05. 2013.

INTERACTION OF RIFAMPICIN EMBEDDED IN PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES WITH BLOOD PLASMA LIPOPROTEINS

M.A. Sanzhakov, O.M. Ipatova, V.N. Prozorovskiy, N.V. Medvedeva, T.I. Torkhovskaya

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: (499) 246-40-08, (499) 246-43-56;
e-mail: torti@mail.ru

The drug formulations of antituberculous remedy rifampicin in nanoparticles less than 30 nm based on soy phosphatidylcholine and sodium oleate was elaborated in Institute of Biomedical Chemistry. The distribution of rifampicin in blood plasma fractions after incubation with this formulation and with free rifampicin was studied. This goal was stimulated by the literature data about activation of macrophages LDL receptors in cases of *M. tuberculosis* infection. Plasma was incubated 30 min with free rifampicin or rifampicin encapsulated into the nanoformulation followed by ultracentrifugation and subsequent rifampicin determination by HPLC in lipoprotein fractions. In the case of free rifampicin it appeared mainly in the plasma protein fraction and in HDL (41% and 38%, correspondentely). But after incubation of rifampicin in nanoparticles the drug redistribution was observed. Its proportion in these factions decreased 2-3-fold, and it was found mainly in LDL (60% as compared with 21% for free rifampicin). The increased association of rifampicin encapsulated into phospholipid nanoparticles with LDL is considered as facilitating factor for macrophages delivery and thus for antituberculosis efficiency as well.

Key words: rifampicin, tuberculosis treatment, phospholipids nanoparticles, low density lipoproteins.