

©Коллектив авторов

ПРЕДНИЗОЛОН В ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ: ПРОЛОНГИРОВАННАЯ ЦИРКУЛЯЦИЯ И ПОВЫШЕННОЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ

*В.Н. Прозоровский, О.М. Ипатова, Е.Г. Тихонова, Т.С. Захарова,
О.С. Дружиловская, Е.И. Короткевич, Т.И. Торховская**

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119221, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: torti@mail.ru

Наряду с новыми лекарственными препаратами, многие терапевтические схемы используют известные эффективные лекарственные средства, в частности, глюкокортикоиды. Среди них одним из наиболее распространённых является преднизолон, обладающий выраженными противовоспалительными свойствами. Недостатком этого лекарства является кратковременная циркуляция в крови, требующая повторных введений и приводящая к ряду побочных эффектов. В связи с этим проводится разработки более эффективных и безопасных лекарственных форм этого препарата. Нами получена композиция преднизолон, включенного в наночастицы из соевого фосфатидилхолина, со средним диаметром 20 нм. При пероральном введении этой композиции показано увеличение максимальной концентрации преднизолон в плазме и длительности его циркуляции по сравнению со свободным лекарством. На мышах с моделью воспаления, индуцированного введением конконавалина А, индекс реакции воспаления (определяемый по отёку конечности) снижался в случае композиции преднизолон в наночастицах существенно активнее, чем при введении свободного лекарства: максимальное снижение индекса (62,2% по сравнению с 49,6%) наблюдалось уже при минимальной дозе вводимого преднизолон (2,5 мг/кг), при которой свободное лекарство вообще не действовало. Полученные результаты указывают на повышение эффективности преднизолон при включении в фосфолипидные наночастицы, что даёт возможность уменьшения вводимых доз и снижает риск побочного действия.

Ключевые слова: преднизолон; фосфолипидные наночастицы; биодоступность; модель воспаления

DOI: 10.18097/PBMC20196503222

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на интенсивные фармакологические исследования и появление на фармацевтическом рынке многих новых эффективных лекарственных соединений, некоторые испытанные классы лекарств по-прежнему остаются востребованными благодаря их выраженным фармакологическим эффектам. К таким лекарствам относятся, в частности, глюкокортикоиды. После их первого выделения из надпочечников в 1930 г. были выявлены их многосторонние противовоспалительные, иммуносупрессивные и в ряде случаев противоопухолевые эффекты, обусловленные воздействием на глюкокортикоидные рецепторы, которые контролируют экспрессию многих генов [1]. Были разработаны и внедрены доступные методы химического синтеза различных производных глюкокортикоидов, и эти препараты активно используются в медицине, чаще всего в качестве противовоспалительных агентов [2]. При этом глюкокортикоиды также препятствуют образованию отека в месте воспаления за счёт уменьшения проницаемости сосудистой стенки. Одним из наиболее распространённых препаратов этой группы является преднизолон, применяемый как местно, так и системно – в виде таблеток или инъекций. В то же время его использование сопряжено с рядом проблем, обусловленных в основном коротким временем циркуляции [2, 3], что требует частых введений препарата, приводящих, в свою очередь, к ряду побочных эффектов [3, 4].

Это обуславливает проведение исследований, направленных на разработку оптимизированных форм преднизолон. Так, для снижения применяемых доз и уменьшения побочных эффектов используют его инкапсулирование в наночастицы различного состава – липосомы, полимерные мицеллы, гибридные наночастицы [2-6].

Внутримышечное введение крысам липосом из фосфатидилхолина с преднизолоном с размером 186 нм (названных авторами “нанолипосомами”, несмотря на явное превышение нанодиапазона) показало улучшение параметров фармакокинетики и фармакодинамики преднизолон по сравнению со свободной формой [7]. Внутривенно вводимые липосомальные частицы, состоящие из гидрофильного ядра с преднизолон-фосфатом, окружённого липидным бислоем фосфолипидов и холестерина, и покрытые ПЭГ, проходят клинические испытания у пациентов с атеросклерозом [8] (с целью оценки воздействия на воспалительные процессы в сосудистой стенке [9]). Разработаны наночастицы из хитозана, содержащие преднизолон, которые испытывают в составе таблеток для лечения астмы [10].

Ранее нами была разработана фосфолипидная транспортная наносистема в виде ультрадисперсной эмульсии наночастиц диаметром 20-30 нм и способ встраивания в неё ряда лекарственных соединений [11-14]. Целью настоящей работы было изучение влияния встраивания преднизолон в фосфолипидные наночастицы на всасывание лекарства в кровь после перорального введения

крысам, а также на его противовоспалительную активность на модели воспаления, индуцированной введением конконавалина А (Кон А) у мышей.

МЕТОДИКА

Получение и характеристика композиции преднизолона, встроенного в фосфолипидные наночастицы

В работе использовали соевый фосфолипид Липоид S100 (LipoidS100, "LipoidGmbH", Германия) с содержанием фосфатидилхолина 94-96%, моногидрат мальтозы ("Merck", Германия), преднизолон, полученный биотехнологическим путём в Центре "Биоинженерии" РАН, стерильную апиrogenную воду для инъекций ("Полифарм", Россия). В качестве антикоагулянта при работе с образцами крови использовали гепарин (раствор для инъекций 5000 МЕ/мл, "Синтез", Россия).

Получение композиции преднизолона, встроенного в фосфолипидные наночастицы, осуществляли как описано ранее для встраивания ряда других лекарств, при соотношении лекарство/фосфолипид 1:10 [11-14]. Мальтозу (25 г) растворяли в 200 мл воды с температурой 45°C, и в полученный раствор добавляли 625 мг преднизолона и 6,25 г Липоида S100. С помощью бытового блендера проводили грубую гомогенизацию полученной смеси, после чего доводили её объём до 250 мл. Полученную грубую эмульсию подвергали нескольким циклам гомогенизации с использованием микрофлюидайзера M110EN30K ("Microfluidics", США).

Процесс повторяли до достижения 60% светопропускания при 660 нм (4-5 циклов), и затем фильтровали для удаления возможных оставшихся крупных частиц через фильтр 220 нм на установке "Millipore Corporation" (США). Размер частиц в полученной эмульсии определяли с использованием лазерного корреляционного спектрометра Submicron particle analyzer N5 ("Beckman-CoulterInc", США). Для определения степени включения преднизолона в фосфолипидные частицы 200 мкл эмульсии вносили в патрон для ультрафильтрации (Ultrafree-MC Filters NMWL 10000 Да), задерживающий частицы массой более 10000 Да, и центрифугировали 20 мин при 3000 g. Концентрацию преднизолона в нижней камере патрона (несвязавшееся лекарство) и в исходном препарате определяли с помощью ВЭЖХ на хроматографе Agilent-1100, как описано ранее [15]. Процент включения преднизолона вычисляли по разности концентраций в исходном образце и растворе, прошедшем через мембрану. Обнаружено, что более 90% преднизолона после проведенной обработки оказывается включённым в наночастицы фосфолипидной эмульсии. Полученную прозрачную эмульсию преднизолона в фосфолипидных наночастицах разливали в стерильные флаконы по 10 мл и лиофилизировали с помощью сублимационной сушки Virtis AdVantage XL (США) при разрежении 30-45 Па и температуре -45°C в течение 45 ч. Перед использованием препарат регидратировали стерильной водой для инъекций

до исходных концентраций. Размер частиц и процент встраивания в них преднизолона после растворения лиофильно высушенного порошка препарата сохранялись.

Оценка динамики концентрации преднизолона в плазме

Влияние включения преднизолона в фосфолипидные наночастицы на динамику его уровня в плазме оценивали в экспериментах на крысах Wistar весом 300-400 г, содержащихся в стандартных условиях. За 16 ч перед началом эксперимента у животных забирали корм, оставляя достаточное количество питья.

В каждой группе использовали по 8 животных, вводя им перорально преднизолон или свободный в воде для инъекций, или в составе полученной композиции, в дозе по 5 мг/кг. После введения преднизолона в течение 1 ч через 20-минутные интервалы осуществляли забор крови из хвостовой вены в пробирки с гепарином. Кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g, и полученные образцы плазмы экстрагировали метанолом (900 мкл на 100 мкл плазмы) при интенсивном перемешивании в течение 3-5 мин. Образцы центрифугировали 10 мин при 5000 g, после чего определяли содержание преднизолона в супернатанте с помощью ВЭЖХ на хроматографе Agilent-1100 [15].

Сравнение противовоспалительной активности преднизолона свободного и включённого в фосфолипидные наночастицы на модели конконавалинового отёка у мышей

Для определения противовоспалительной активности полученную композицию преднизолона в фосфолипидных наночастицах (с концентрацией 2,5 мг/мл) готовили в трёх разведениях – в 2 раза, в 5 раз и в 10 раз (получая таким образом эмульсии с концентрациями 1,25 мг/мл, 0,5 мг/мл и 0,25 мг/мл). Использовали мышей-самцов линии СВА весом 20 г. По 0,4 мл разведённой эмульсии вводили перорально каждой мыши в трёх группах (то есть в дозах 25 мг/кг, или 5 мг/кг, или 2,5 мг/кг соответственно). В тех же разведениях и дозах вводили свободный преднизолон. Животные контрольной группы получали тот же объём стерильной воды. В каждой группе было по 8-9 животных

Через 1 ч после введения преднизолона всем группам мышей вводили субплантарно (в подушечку задней стопы) 20 мкл раствора конконавалина А (Кон А) с концентрацией 5 мг/мл; в другую конечность вводили тот же объём (20 мкл) физиологического раствора. Ещё через 1 ч мышей забивали, оценивали массу воспалённой и невоспалённой стоп и рассчитывали для каждой группы индекс реакции воспаления (Ир) как процент увеличения массы стопы (по сравнению со здоровой конечностью, без Кон А), по формуле:

$$I_p = \frac{P_{оп} - P_k}{P_k} \times 100\%,$$

где $P_{оп}$ – масса стопы, в подушечку которой вводили Кон А, P_k – масса стопы, в подушечку которой вводили физиологический раствор.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Размер частиц в полученной фосфолипидной наноэмульсии преднизолона был близок к таковому для получаемых нами ранее фосфолипидных наночастиц с включением ряда других лекарств [11-14] и составлял 19 ± 2 нм. На рисунке 1 показаны изменения концентрации преднизолона в крови крыс в течение 1 ч после его перорального введения в составе полученных фосфолипидных наночастиц или свободной формы лекарства.

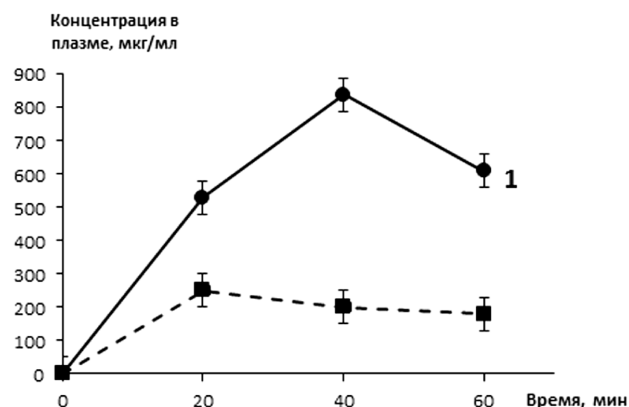


Рисунок 1. Изменение содержания преднизолона в крови крыс после перорального введения в составе фосфолипидных наночастиц (1) и в свободной форме (2).

Как видно из рисунка 1, хотя $t_{\text{макс}}$ (время достижения максимальной концентрации в плазме крови) для включённого в фосфолипидные наночастицы преднизолона наступает позже, чем для свободного, его уровень достигаемый в плазме ($C_{\text{макс}}$) оказывается почти в 4 раза выше (820 мкг/мл), чем для свободного лекарства (230 мкг/мл). И в конце эксперимента, через 1 ч после введения, концентрация преднизолона у мышей, получивших его в составе наночастиц, остаётся по-прежнему выше (в 3 раза), чем для свободной формы. В результате этого принятый для оценки биодоступности параметр — площадь под кривой “концентрация — время” (AUC, *area under curve*) — оказывается для преднизолона в фосфолипидной композиции в среднем в 5 раз выше, чем для свободной субстанции. То есть, включение преднизолона в фосфолипидные наночастицы размером порядка 20 нм приводит к изменению таких фармакокинетических характеристик, как AUC, $t_{\text{макс}}$, $C_{\text{макс}}$, что в целом обеспечивает повышение биодоступности. При этом следует подчеркнуть, что наноразмер несущих преднизолон фосфолипидных наночастиц оказывается существенным фактором, способствующим — в отличие от описанных ранее его липосомальных композиций, вводимых инъекционно [7, 8] — его абсорбции и относительно длительной циркуляции.

Улучшение фармакокинетики преднизолона при включении в фосфолипидные наночастицы, повышение его биодоступности должно способствовать увеличению терапевтической эффективности

лекарства, что было продемонстрировано в эксперименте на модели воспаления у мышей — отёке, индуцированном конконавалином А (рис. 2).

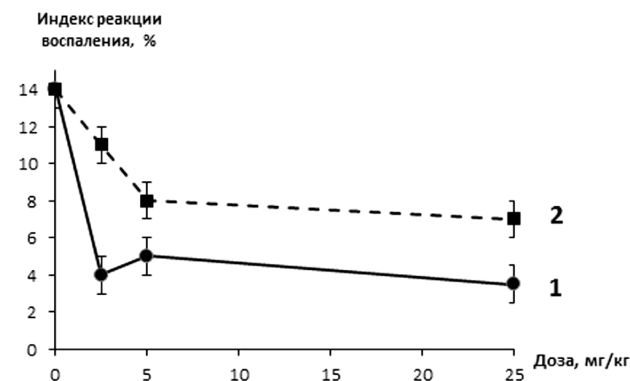


Рисунок 2. Индекс реакции воспаления при индуцированном конконавалином А отёке у мышей после введения различных доз преднизолона в фосфолипидных наночастицах (1) или свободного (2).

Как видно из рисунка 2, предварительное пероральное введение животным относительно низких доз преднизолона (2,5 мг/кг) в виде свободной субстанции не вызывало значимого подавления интенсивности Кон А-индуцированной реакции воспаления по сравнению с контрольной группой, не получившей преднизолон. И только увеличение дозы до 5 мг/кг и особенно до 25 мг/кг приводило к значимому подавлению реакции воспаления (на 43% и 49,6% по сравнению с контролем, соответственно). В отличие от этого, введение преднизолона в составе разработанной композиции уже в минимальной использованной дозе (2,5 мг/кг) приводило к существенному подавлению реакции воспаления — на 62,2%, то есть даже большему, чем 10-кратная (25 мг/кг) доза свободного лекарства. Дальнейшее повышение концентрации вводимого в составе этой композиции лекарства было, как видно из рисунка 2, нецелесообразным, так как уже небольшой дозы в данном случае оказалось достаточно для максимально возможного проявления противовоспалительного действия этого глюкокортикоида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Включение преднизолона в фосфолипидные наночастицы с размером 20 нм позволяет получить новую, более эффективную лекарственную форму для его наиболее удобного, перорального введения, с повышенной всасываемостью, биодоступностью и вследствие этого — увеличением противовоспалительной специфической активности. При введении в составе такой композиции высокая активность этого глюкокортикоида, продемонстрированная на модели воспаления, даёт возможность уменьшения вводимых доз и тем самым снижения риска побочного действия этого эффективного противовоспалительного препарата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова – д.б.н. Л.П. Коваленко и д.б.н. Н.Н. Золотову за консультации и помощь в проведении экспериментальных исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Российского Национального Комитета по биоэтике (“Этические и правовые проблемы клинических испытаний и научных экспериментов на человеке и животных”, М., 1994).

ЛИТЕРАТУРА

- Cheung J., Smith D.F. (2000) *Mol. Endocrinol.*, **14**(7), 939-946.
- Lühder F., Reichardt H.M. (2017) *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(9), 1836.
- Teshima M., Kawakami S., Fumoto S., Nishida K., Nakamura J., Nakashima M., Nakagawa H., Ichikawa N., Sasaki H. (2006) *Biol. Pharm. Bull.*, **29**(7), 1436-1440.
- Ozbakir B., Crielaard B.J., Metselaar J.M., Storm G., Lammers T. (2014) *J. Control Release*, **190**, 624-636.
- Katzer T., Chaves P., Bernardi A., Pohlmann A., Guterres S.S., Ruver Beck R.C. (2014) *J. Microencapsul.*, **31**(6), 519-528.
- Moribe K., Fukino M., Tozuka Y., Higashi K., Yamamoto K. (2009) *Int. J. Pharm.*, **380**(1-2), 201-205.
- Hosseini S.H., Maleki F., Eshraghi H.R., Hamidi M. (2016) *Drug Deliv.*, **23**(8), 3008-3016.
- Valk F.M., Wijk D.F., Lobatto M.E., Verberne H.J., Storm G., Willems M.C., Legemate D.A., Nederveen A.J., Calcagno C., Mani V., Ramachandran S., Paridaans M.P., Otten M.J., Dallinga-Thie G.M., Fayad Z.A., Nieuwdorp M., Schulte D.M., Metselaar J.M., Mulder W.J., Stroes E.S. (2015) *Nanomedicine*, **11**(5), 1039-1046.
- Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K. (2011) *Nature*, **473**, 317-325.
- Chen Y.D., Liang Z.Y., Cen Y.Y., Zhang H., Han M.G., Tian Y.Q., Zhang J., Li S.J., Yang D.S. (2015) *Drug Des. Devel. Ther.*, **9**, 5815-5825.
- Медведева Н.В., Торховская Т.И., Кострюкова Л.В., Захарова Т.С., Кудинов В.А., Касаткина Е.О., Прозоровский В.Н., Ипатова О.М. (2017) *Биомед. химия*, **63**(1), 56-61. [Medvedeva N.V., Torkhovskaya T.I., Kostryukova L.V., Zakharova T.S., Kudinov V.A., Kasatkina E.O., Prozorovskii V.N., Ipatova O.M. (2017) *Biomeditsinskaya khimiya*, **63**(1), 56-61.]
- Ипатова О.М., Торховская Т.И., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Иванова Н.Д., Широнин А.В., Баранова В.С., Арчаков А.И. (2010) *Биомед. химия*, **56**(1), 101-119. [Ipatova O.M., Torkhovskaya T.I., Medvedeva N.V., Prozorovskii V.N., Ivanova N.D., Shironin O.M., Baranova V.S., Archakov A.I. (2010) *Biomeditsinskaya khimiya*, **56**(1), 101-119.]
- Широнин А.В., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г., Захарова Т.С., Санжаков М.А., Торховская Т.И. (2011) *Биомед. химия*, **57**(6), 671-676. [Shironin O.M., Ipatova O.M., Medvedeva N.V., Prozorovskii V.N., Tikhonova E.G., Zakharova T.S., Sanzhakov M.A., Torkhovskaya T.I. (2011) *Biomeditsinskaya khimiya*, **57**(6), 671-676.]
- Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Игнатов Д.В., Дружиловская О.С., Кудинов В.А., Касаткина Е.О., Тихонова Е.Г., Ипатова О.М. (2015) *Биомед. химия*, **61**(2), 219-230. [Medvedeva N.V., Prozorovskii V.N., Ignatov D.V., Druzhilovskaya O.S., Kudinov V.A., Kasatkina E.O., Tikhonova E.G., Ipatova O.M. (2015) *Biomeditsinskaya khimiya*, **61**(2), 219-230.]
- Ипатова О.М., Зыкова М.Г., Торховская Т.И., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н. (2009) *Биомед. химия*, **55**(2), 185-194. [Ipatova O.M., Zyкова M.G., Torkhovskaya T.I., Medvedeva N.V., Prozorovskii V.N. (2009) *Biomeditsinskaya khimiya*, **55**(2), 185-194.]

Поступила в редакцию: 12. 04. 2019.
После доработки: 10. 06. 2019.
Принята к печати: 11. 06. 2019.

**PREDNISOLONE IN PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES: PROLONGED CIRCULATION
AND INCREASED ANTIINFLAMMATORY EFFECT**

*V.N. Prozorovskii, O.M. Ipatova, E.G. Tikhonova, T.S. Zakharova,
O.S. Druzhilovskaya, E.I. Korotkevich, T.I. Torkhovskaya**

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: torti@mail.ru

Along with modern new drugs, many therapeutic schemes also include known effective drugs, particularly, glucocorticoids. One of the most distributed of them is prednisolone that has pronounced anti-inflammatory properties. Its disadvantage is short-term circulation, resulting in a number of side effects. For this reason the development of its more effective and safe formulations is carried out. We have obtained the formulation of prednisolone included in nanoparticles from soy phosphatidylcholine with an average diameter of 20 nm. With oral administration to rats and analysis by HPLC an increase in prednisolone maximal concentration in of plasma and the duration of circulation as compared with free drug administration were shown. The experiment with mice with concanavalin A induced inflammation was also carried out: concanavalin A was injected subplantary in an hour after oral administration of both prednisolone formulations in several doses. The index of the inflammatory reaction (determined by the edema degree) was suppressed more effectively in the case of prednisolone in nanoparticles. Maximal suppression (62.2% as compared with 49.6% for free prednisolone) was observed even at a minimal dose (2.5 mg/kg), at which the free drug did not act at all. The results indicate an increase in the efficiency of prednisolone included in phospholipid nanoparticles, that makes it possible to diminish its administered doses and thereby reduce the risk of side effects.

Key words: prednisolone; phospholipid nanoparticles; bioavailability; inflammation model

Funding. The work was carried out within the Program of fundamental scientific research of the state academies of Sciences for 2013-2020.

Received: 12.04.2019, revised: 10.06.2019, accepted: 11.06.2019.