

УДК 576.3.314; 616.36002; 615.2.244

©Коллектив авторов

АНТИРЕВМАТОИДНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТОТРЕКСАТА, ВКЛЮЧЕННОГО В ФОСФОЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ (ФОСФОГЛИВ)

М.Г. Зыкова, В.Н. Прозоровский, О.М. Ипатова, Т.И. Торховская, В.В. Глазатов*

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва,
Погодинская ул., д. 10; тел.: (495) 708-38-07; эл. почта: zykova@ibmc.msk.ru

Применение цитостатика (метотрексата) в качестве средства базисной терапии ревматоидного артрита ограничено из-за риска побочных эффектов и быстрого выведения лекарства из области сустава, поэтому была разработана новая, стабилизированная лекарственная форма метотрексата с использованием фосфолипидных мицелл. В качестве носителя для этой цели была применена инъекционная форма недавно разработанного в ГУ НИИ БМХ РАМН препарата “Фосфоглив”, которая представляет собой эмульсию фосфолипидных наночастиц с размером до 50 нм, стабилизированных глицерилфосфатом. С использованием ВЭЖХ подобраны условия максимального включения метотрексата в наночастицы Фосфоглива (до 60%). На моделях адъювантного артрита у крыс показана более высокая терапевтическая эффективность такого препарата по сравнению со свободным метотрексатом, проявляющаяся как в снижении отека конечности, так и торможении вторичной воспалительной реакции. Обсуждается повышение антиревматической активности разработанного препарата за счет присутствия в нем глицерилфосфата, обладающей противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами. Предполагается возможность клинического применения новой лекарственной формы метотрексата для внутрисуставного введения при лечении ревматоидного артрита.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, метотрексат, наночастицы, фосфолипиды, фосфатидилхолин, глицерилфосфат.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время, наряду с созданием новых лекарственных препаратов много внимания уделяется модификации лекарственных форм известных субстанций, с целью максимально возможного улучшения их свойств - повышения эффективности и биодоступности, снижения побочных действий. Этому способствуют интенсивно развивающиеся в последние годы нанотехнологии [1], в частности, включение лекарственного соединения в наночастицы. Получаемые таким образом новые формы известных лекарственных препаратов, сохраняя механизм действия, позволяют избавиться от ряда недостатков, присущих свободному лекарству (см. обзоры [1-3]). Наибольший интерес при таком подходе вызывают лекарства, относящиеся к классу цитостатиков, так как обладают выраженными побочными действиями. Одним из таких препаратов является метотрексат (МТ).

Известно, что МТ тормозит синтез ДНК за счет ингибирования дигидрофолатредуктазы, участвующей в синтезе пуриновых нуклеотидов [4]. Этим и обусловлена его противоопухолевая активность, которой способствует также повышенная экспрессия в опухолевых клетках фолатных рецепторов, проявляющих сродство к МТ [5].

* - адресат для переписки

Работы по получению различных липосомальных форм МТ ведутся уже более 10 лет. Они направлены на улучшение его фармакокинетических свойств, в том числе на повышение эффективности и снижение побочного действия. Так, ряд исследователей приводят лабораторные методы химического конструирования “про-лекарства” на основе синтезированных липофильных производных МТ с диглицеридом [6] или фосфолипидом [7], включенных в липосомы. Для лечения опухолей центральной нервной системы были синтезированы нагруженные МТ наночастицы из полибутилцианоакрилата размером 100 нм [8]. Получены также парамагнитные наночастицы из оксида железа, ковалентно связанные с МТ через аминопропилтриметоксисилан. На клетках HeLa было показано высвобождение из них лекарства при низком pH в лизосомах [9]. Kukowska-Latallo с соавт. использовали в качестве носителя МТ дендримерные наночастицы, конъюгированные с фолиевой кислотой, что усилило сродство лекарства к фолатным рецепторам опухоли. При введении таких наночастиц крысам с эпителиальным раком наблюдали высокую степень их накопления в опухолевых клетках и повышенную терапевтическую активность, наряду с отчетливым снижением токсичности по сравнению со свободным МТ [5]. В качестве наночастиц, содержащих МТ, использовали также конъюгаты с декстран-пептидом [10], твердые липидные наночастицы, полученные на основе стеариновой кислоты [11]. Применение наночастиц позволило увеличить время циркуляции МТ.

С начала 90-х годов МТ, помимо лечения опухолевых заболеваний, применяется в качестве средства базисной терапии ревматоидного артрита (в виде пероральной или чаще всего инъекционной формы) [4, 12]. Применение МТ для лечения больных воспалительными заболеваниями суставов связано с тем, что поражение соединительной ткани (преимущественно суставов) при ревматоидном артрите является следствием развивающихся иммунопатологических реакций (аутоагрессия), что имеет некоторое сходство с онкологическими заболеваниями [13]. Кроме этого, антиартритное и антиревматоидное действие МТ обусловлено подавлением продукции NO в перитонеальных макрофагах [13], активацией выработки противовоспалительных цитокинов (интерлейкинов-8 и -4) [14], а также влиянием на измененный метаболизм костной ткани [15].

Однако, несмотря на положительные эффекты, применение МТ ограничено. Это связано с высокой гепатотоксичностью его пероральной и инъекционной форм [16]. Локальное (внутрисуставное) введение МТ также не приводит к желаемым результатам из-за короткого времени экспозиции в полости сустава, т.е. ускоренной резорбции.

В работах ряда авторов [17, 18] на примере дексаметазона и гидрокортизона было показано, что скорость резорбции лекарства из полости сустава снижается при введении его в липосомальной форме. Позже было обнаружено [19, 20], что и липосомальный МТ при внутривенном и внутримышечном введении крысам и внутрисуставном введении кроликам с моделью артрита проявляет более высокую эффективность по сравнению со свободным лекарством, подавляя развитие синовиальной гиперплазии и клеточной инфильтрации. Повышенное противовоспалительное действие наблюдалось также для липосом, содержащих фосфолипидный конъюгат МТ [21].

Несмотря на проводимые исследования, пока нет сообщений о реальной новой оптимизированной лекарственной форме МТ для внутрисуставного введения, готовой для практического применения.

В ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН разработан и внедрен в медицинскую практику для лечения заболеваний печени лекарственный препарат “Фосфоглив”. Его инъекционная форма представляет собой фосфолипидные наночастицы размером 35-50 нм, стабилизированные глицерризиновой кислотой [22, 23]. Потенциально эта фосфолипидная наносистема по своим характеристикам может быть использована также и для другой цели – для оптимизации свойств лекарственных соединений, в частности, - МТ.

Возможность включения МТ в фосфолипидные частицы обусловлена наличием в его молекуле двух карбоксильных групп, способных в слабощелочной среде взаимодействовать с холиновой группой фосфатидилхолина. Кроме того, входящая в состав Фосфоглива глицирризиновая кислота обладает противовоспалительными, противоаллергическими и иммуномодулирующими свойствами, является синергистом глюкокортикостероидов, что может способствовать усилению антиревматической активности МТ [23].

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы было изучение эффективности МТ, включенного в фосфолипидные наночастицы инъекционной формы Фосфоглива, в сравнении со свободным МТ на модели адьювантного артрита у крыс.

МЕТОДИКА. Были отработаны условия максимального включения лекарства в фосфолипидные частицы [24]. 18 мг МТ растворяли в 0,01 М NaHCO_3 и добавляли смесь исходных соединений (субстанций), применяющихся при получении Фосфоглива, а именно 0,5 г соевого фосфатидилхолина (Lipoid S100, "Lipoid", Германия), 0,2 г тринатриевой соли глицирризиновой кислоты ("Zhangjiagang Free Trade Zone Mafco Liantai Biotech Co., Ltd", Китай) и 2 г моногидрата мальтозы. Полученную водную суспензию в течение 5 минут гомогенизировали с использованием гомогенизатора высокого давления RANNIE MiniLab 7.30VN (Дания). Для определения степени включения МТ в фосфолипидные частицы последние отделяли гельфильтрацией на сефадексе G-25 с элюцией 0,2% раствором ацетатата аммония. Собирали материал пика RT 7,07 мин. После его лиофилизации и удаления фосфолипидов остаток растворяли в 10% водном растворе ацетонитрила и анализировали количество МТ с помощью ВЭЖХ на аппаратуре Милихром А-02, с градиентом ацетонитрила от 10 до 90%. Концентрацию МТ детектировали по УФ поглощению при 258 нм, используя предварительно построенную калибровочную кривую. Определенное таким образом количество МТ, включенного в фосфолипидные частицы, составляло 60% от его общего количества в препарате. Препарат после гомогенизации фильтровали через фильтр 0,45 мкм, разливали во флаконы по 10 мл и лиофилизировали с использованием лабораторной лиофильной сушилки LioLab F.

Размер фосфолипидных везикул в препарате, оцененный с помощью лазерного корреляционного спектрометра Интокс (Россия), составлял около 50 нм; светопропускание (Т) при 660 нм (позволяющее оценить гомогенность препарата) до 75%, причем оба эти параметра сохраняются после лиофилизации и повторного растворения.

Для определения биологической эффективности содержимое флакона непосредственно перед использованием растворяли в 10 мл воды для инъекций. Сравнение биологической эффективности свободного МТ и включенного в наночастицы Фосфоглива проводили на модели адьювантного артрита у крыс с выраженной активностью воспалительного процесса, сопровождающегося значительными дистрофическими изменениями хряща.

Адьювантный артрит у крыс моделировали с помощью микобактерий вакцинного штамма БЦЖ-1. Суспензию микобактерий в минеральном масле вводили субплантарно однократно в правую лапу крысы. Степень первичной воспалительной и вторичной иммунологической реакции оценивали в динамике в течение 30 суток по изменению объема сустава инъецированной и не инъецированной конечности. Объем суставов измеряли онкометрически с помощью плетизмометра (Ugo Basile).

Метотрексат вводили под наркозом в голеностопный сустав животного 1 раз в неделю в дозе 0,18 мг. Разовая доза испытуемого препарата (по 0,1 мл) содержала такое же количество МТ плюс соответствующее количество фосфоглива – 5,0 мг фосфатидилхолина и 2,0 мг тринатриевой соли глицирризиновой кислоты. Лечение проводили в течение 3-х недель, начиная с 14-15 дня после введения БЦЖ, когда у экспериментальных животных отмечали полностью сформированные

АКТИВНОСТЬ МЕТОТРЕКСАТА В ФОСФОГЛИВЕ

признаки системной патологии (полиартрита). Животные были разделены на 3 группы по 9–10 крыс в каждой: 1) получавших свободный МТ, 2) получавших МТ, включённый в “Фосфоглив” и 3) контрольная группа животных, не получавшая лечения. Воспалительную реакцию и эффект лечения оценивали по степени увеличения объема голеностопных суставов, изменению массы тела и др. В конце эксперимента проводили морфологические исследования голеностопных суставов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Обе формы МТ снижали динамику воспалительной реакции в инъектированной конечности, однако эффект был существенно более выраженным в случае МТ, включённого в “Фосфоглив”, т.е. фосфолипидной формы МТ (рис. 1). Если при введении свободного препарата (МТ) в течение всего эксперимента наблюдали постепенное, хоть и более медленное, чем в контроле, возрастание воспалительной реакции, то у животных, получавших МТ, включённый в “Фосфоглив”, увеличение воспалительной реакции практически прекратилось после 14-ого дня эксперимента, после чего размер инъектированной конечности не изменялся.

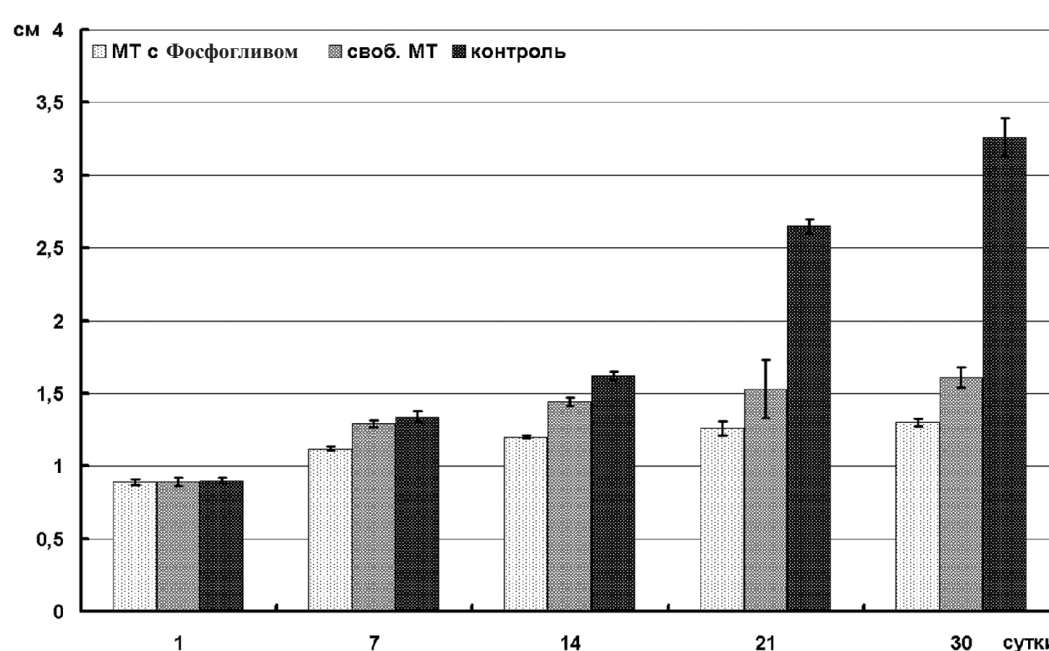


Рисунок 1.

Динамика воспалительной реакции (увеличение отека) в инъектированной конечности у крыс с моделью адьювантного артрита при введении свободного МТ и МТ с Фосфогливом.

МТ в форме фосфолипидных наночастиц проявил более выраженную активность и в торможении вторичной иммунологической реакции, фиксируемой по классическим признакам воспаления, - отёку другой конечности, гиперемии, болезненности (рис. 2).

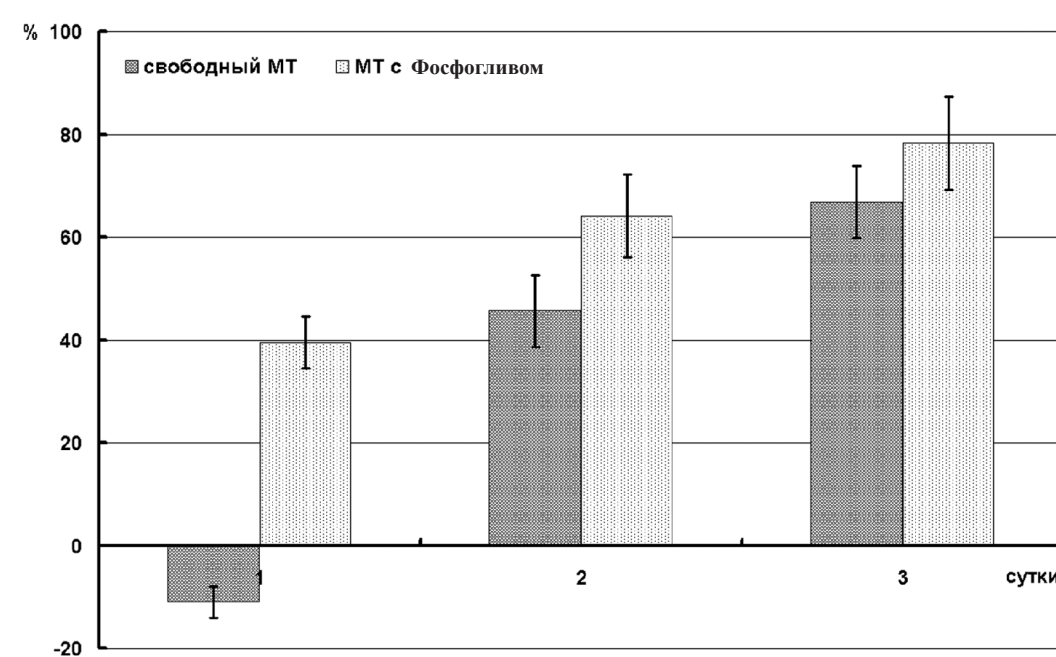


Рисунок 2.

Торможение (%) вторичной иммунологической реакции у крыс с моделью адьювантного артрита под действием свободного МТ и МТ с Фосфогливом*.

*- за 100% принята степень снижения отека неинъектированной конечности по сравнению с контролем в каждом временном интервале.

Если эффект свободного МТ начал проявляться лишь на 7-8-ой день, давая к 10-ому дню лечения в среднем лишь 40-50%-ное торможение воспаления по сравнению с контролем, то для МТ на Фосфогливе тормозящий эффект проявлялся уже с самого начала лечения, приводя к той же степени поражения вдвое раньше, а через 10 дней вызывая 64%-торможение воспалительной реакции.

Таким образом, еженедельное внутрисуставное введение МТ в форме фосфолипидных наночастиц вызывает значительное подавление как острой, так и вторичной воспалительной реакции голеностопных суставов крыс. При этом антиартритный эффект такой лекарственной композиции существенно превосходил эффект свободного МТ.

Выявлено положительное влияние препарата и на морфологические изменения суставов конечностей экспериментальных животных. Так, показано существенное снижение степени выраженности гиперплазии синовиальной оболочки. Синовиоциты образовывали только 1-3 слоя (вместо 4-6 в контроле), без фибринозных наложений, со слабо выраженными явлениями ангиоматоза и инфильтрации лимфоцитами и гистиоцитами, активно проявляющимися в других группах животных. В гиалиновом хряще у крыс, леченных МТ на Фосфогливе, наблюдались лишь небольшие очаги базофилии межтерриториального матрикса, в отличие от его выраженной разволокненности, с явлениями базофилии, в других группах.

Результаты указывают на выраженное противовоспалительное действие исследуемой лекарственной композиции, уменьшение воспалительной реакции и пролиферации синовиоцитов и кровеносных сосудов.

Полученные данные позволяют предположить терапевтическую эффективность разработанного препарата, обусловленную увеличением времени экспозиции МТ в полости сустава. Лечебный эффект препарата может повышаться также и за счёт присутствия в нем глицирризиновой кислоты, обладающей противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами [23]. Кроме того, внутрисуставное введение Фосфоглива (основным компонентом которого является фосфатидилхолин), повышает соотношение фосфатидилхолин/лизофосфатидилхолин в синовиальной жидкости, которое, как недавно показано, обратно пропорционально выраженности симптомов ревматоидного артрита [25].

Результаты позволяют предположить, что разработанная форма МТ на фосфогливе может существенно повысить действенность лечения больных ревматоидным артритом путем локальной внутрисуставной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Couvreux P., Vauthier C.* (2006) *Pharm. Res.*, **23**, 1417-1450.
2. *Yih T.C., Al-Fandi M.* (2006) *J. Cell Biochem.*, **97**, 1184-1190.
3. *Drummond D., Meyer O., Hong K., Kirpotin D., Papahadjopoulos D.* (1999) *Pharmacol. Rev.*, **51**, 691-743.
4. *Dolhain R.I., Talk P.P., Dijkmans B.A., De Kuiper P., Breedveld F.C., Miltenburg A.M.* (1998) *Br. J. Rheumatol.*, **37**, 502-508.
5. *Kukowska-Latallo J.F., Candido K.A., Cao Z., Nigavekar S.S., Majoros I.J., Thomas T.P., Balogh L.P., Khan M.K., Baker J.R.* (2005) *Cancer Res.*, **65**, 5317-5324.
6. *Водовозова Е.Л., Евдокимов Д.В., Молотковский Ю.Г.* (2004) *Биоорганическая химия*, **30**, 663-665.
7. *Ioffe V., Kalendarev T., Rubinstein I., Zabetski R., Zupkovitz G.* (2004) *J. Chromatogr. A.*, **1031**, 249-258.
8. *Gao K., Jiang X.* (2006) *Int. J. Pharm.*, **310**, 213-219.
9. *Kohler N., Sun C., Wang J., Zhang M.* (2005) *Langmuir*, **21**, 8858-8864.
10. *Chau Y., Tan F.E., Langer R.* (2004) *Bioconjug. Chem.*, **15**, 931-941.
11. *Ruckmani K., Sivakumar M., Ganeshkumar P.A.* (2006) *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **6**, 2991-2995.
12. *Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е., Чичасова Н.В., Чемерис Н.А.* (2005) *Клин. фарм. терапия*, **1**, 72-75.
13. *Omata T., Segawa Y., Inoue N., Tsuzuike N., Itokazu Y., Tamaki H.* (1997) *Res. Exp. Med. (Berl.)*, **197**, 81-90.
14. *Schuerwegh A.J., van Offel J.F., Bridts C.H., Stevens W.J., De Clerck L.S.* (2001) *J. Rheumatol.*, **28**, 1793-1799.
15. *Suzuki Y., Nakagawa M., Masuda C., Ide M., Uehara R., Ichikawa Y., Mizushima Y.* (1997) *J. Rheumatol.*, **24**, 1890-1895.
16. *Groff G.D., Shenberger K.N., Wilke W.S., Taylor T.H.* (1983) *Semin. Arthritis Rheum.*, **12**, 333-347.
17. *Давиденкова Е.Ф., Тернова Н.К., Розенберг О.А., Носкин Л.А., Лошакова Л.В.* (1984) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **97**, 656-658.
18. *Bonanomi M.H., Velvart M., Stimpel M., Roos K.M., Fehr K., Weder H.G.* (1987) *Rheumatol. Int.*, **7**, 203-212.
19. *Foong W.C., Green K.L.* (1993) *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, 204-209.
20. *Kim M.M., Lee S.H., Lee M.G., Hwang S.J., Kim C.K.* (1995) *Biopharm. Drug Dispos.*, **16**, 279-293.
21. *Williams A.S., Camilleri J.P., Goodfellow R.M., Williams B.D.* (1996) *Br. J. Rheumatol.*, **35**, 719-724.

22. Арчаков А.И., Сельцовский А.П., Лисов В.И., Цыганов Д.И., Княжев В.А., Ипатова О.М., Торховская Т.И. (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 139-151.
23. Ипатова О.М. (2005) Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике. Под редакцией акад. РАМН А.И.Арчакова, М., Изд. ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН.
24. Заявка на патент № 2006114078 "Лекарственный препарат и способ лечения ревматических заболеваний", дата приоритета 26.04.06
25. Fuchs B., Schiller J., Wagner U., Hantzschel H., Arnold K. (2005) *Clin. Biochem.*, **38**, 925-933.

Поступила: 28. 12. 2006.

ANTIRHEUMATOID ACTIVITY OF METHOTREXATE IN PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES (PHOSPHOGLIV)

M.G. Zyкова, V.N. Prozorovskiy, O.M. Ipatova, T.I. Torkhovskaya, V.V. Glazatov

Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia;
tel.: (495) 708-38-07; e-mail: zyкова@ibmc.msk.ru

The efficiency of methotrexate use in basic therapy of rheumatoid arthritis is limited because of risk of side effects and fast drug efflux from zone of joints as well. The new stabilized form of methotrexate was elaborated with phospholipid micelles as a carrier. The injective form of the preparation Phosphogliv was used for this purpose. Phosphogliv has recently been developed in the Institute of Biomedical Chemistry (Moscow), as the emulsion of 50 nm phospholipid nanoparticles stabilized by glycyrrhizic acid. The conditions of maximal methotrexate incorporation into the phospholipid nanoparticles were optimised under control of HPLC (60% of total methotrexate was associated with nanoparticles, with remaining drug being in free form in the water phase). Such preparation revealed higher therapeutic efficiency in experimental adjuvant arthritis in rats as compared with free methotrexate. The increase of antirheumatoid activity of the elaborated preparation may also be attributed to the influence of glycyrrhizic acid, possessing both antiinflammatory and immune properties. The possibility of clinical employment of a new methotrexate drug form for rheumatoid arthritis treatment is discussed.

Key words: rheumatoid arthritis, methotrexate, nanoparticles, phospholipids, phosphatidylcholine, glycyrrhizic acid.