

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 576.3.3144; 616.36002; 615.2.244

©Коллектив авторов

ПОВЫШЕНИЕ БИОДОСТУПНОСТИ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНДОМЕТАЦИНА ПРИ ВСТРАИВАНИИ В ФОСФОЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

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

Учреждение Российской Академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Погодинская ул., 10, 119121 Москва; тел.: (495)246-43-56; эл. почта: torti@mail.ru

Получена лекарственная композиция на основе растительного фосфатидилхолина и противовоспалительной лекарственной субстанции – индометацина с размером частиц менее 50 нм. При её пероральном введении крысам биодоступность индометацина была более чем в 2 раза выше, чем для свободного лекарства. На двух моделях воспаления (адьювантный артрит у крыс и индуцированный конконавалином А отёк у мышей) показана повышенная противовоспалительная активность индометацина, включённого в фосфолипидные наночастицы, по сравнению с его свободной формой. Повышенная биодоступность индометацина при введении его фосфолипидной композиции позволяет снизить дозу для достижения терапевтического эффекта, что уменьшает риски возникновения побочных проявлений.

Ключевые слова: индометацин, фосфолипидные наночастицы, всасывание, биодоступность, адьювантный артрит, конконавалин А

ВВЕДЕНИЕ. Производное индолуксусной кислоты индометацин – нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП), широко используемый при терапии острых и хронических артритов и ревматических заболеваний. Механизм действия индометацина основан на ингибировании циклооксигеназы-2 – фермента, вовлечённого в образование провоспалительного простагландина PGE₂ [1]. Недостатком этого препарата, как и других НПВП, являются выраженные побочные эффекты, особенно ulcerогенное (вызывающее язву) действие. Однако, высокая терапевтическая эффективность индометацина стимулирует разработки его новых лекарственных форм, направленных на снижение риска и тяжести побочных эффектов [1-3].

Разрабатываются системы контролируемого высвобождения индометацина, снабжённого различного рода микро- и нанопереносчиками на основе биodeградируемых полимеров [4-7]. Имеются данные о повышении биодоступности и противовоспалительной активности индометацина и снижении вероятности возникновения язв при парентеральном введении животным после включения его в липосомы различного состава [8]. Похожие результаты получены для конъюгата фосфатидилхолина с индометацином [9]. Разработана лекарственная форма индометацина с фосфатидилхолином и соевым маслом, в виде желатиновых капсул, снижающая ulcerогенное действия лекарства [10-12]. В пользу

* - адресат для переписки

ИНДОМЕТАЦИН В ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

применения этого фосфолипида совместно с НПВП свидетельствуют также данные о его противовоспалительном эффекте при пероральном введении крысам с индуцированной каррагенином моделью артрита [13].

Таким образом, анализ литературы свидетельствует об эффективности сочетания в лекарственной форме индометацина и фосфатидилхолина [8-12], а также о возможном её повышении при снабжении индометацина нанопереносчиками [4-7].

В Научно-исследовательском институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН разработана технология получения фосфолипидной транспортной наносистемы в виде ультрадисперсной эмульсии наночастиц диаметром 20-30 нм, и разработан способ встраивания в неё индометацина [14-16]. Целью настоящей работы было изучение влияния встраивания индометацина в фосфолипидные наночастицы на всасывание лекарства в кровь после перорального введения крысам, а также на его противовоспалительную активность на двух моделях воспаления: адьювантного артрита у крыс и реакции воспаления, индуцированной введением конконавалина А, у мышей.

МЕТОДИКА.

Получение нанофосфолипидной (НФ) композиции индометацина. Использовали соевый фосфолипид Lipoid S100 ("Lipoid", Германия) с содержанием фосфатидилхолина $\geq 95\%$, моногидрат мальтозы ("Merck", Германия) и субстанцию индометацина ("Huzhou Synthetic Farmaceutical Factory", Китай). Грубую эмульсию соевого фосфолипида (25 мг/мл) с индометацином (2,5 мг/мл) в 10% водном растворе мальтозы пропускали через микрофлюидайзер M110EN30K ("Microfluidics", США) под давлением 1000 атм при 42-50°C. Процесс повторяли до достижения 60% светопропускания при 660 нм (4-5 циклов). После стандартизирующей и стерилизующей фильтрации через фильтры с размером пор 220 нм на установке YY3009000 (Millipore, США) эмульсию разливали во флаконы по 10 мл и лиофилизировали на лабораторной установке Virtis Advantage XL (США). Подробно технология получения НФ лекарственной композиции индометацина изложена в заявке на изобретение [14].

Определение биодоступности НФ и свободной форм индометацина по накоплению лекарства в крови. Эксперименты проводили на крысах-самцах породы Wistar массой 300 \pm 20 г. Для перорального введения НФ композицию индометацина разводили водой, суспензию свободного индометацина готовили в 4% растворе мальтозы. Животных делили на две группы (по 5 животных в каждой). Препараты вводили животным в объёме 1 мл в дозе 5 мг/кг. Через заданные промежутки времени из хвостовой вены отбирали кровь в пробирки с ЭДТА. Экстракцию индометацина осуществляли 9-кратным объёмом метанола. В метанольных экстрактах индометацин определяли, используя хроматограф Agilent 1100, соединённый с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Agilent G1956B ("Agilent Technologies", США), функционирующим в системе электрораспыления (Electrospray, API-ES⁺). В качестве внутреннего стандарта использовали диклофенак (значения m/z для индометацина и диклофенака 358,1 и 296,0, соответственно). Концентрацию индометацина в образцах определяли по калибровочной кривой зависимости соотношений площадей пиков индометацина и внутреннего стандарта от соотношений их концентрации. Результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения ChemStation B.03.01.

Оценка противовоспалительного действия индометацина в свободной форме и в составе НФ-композиции на модели адьювантного артрита у крыс. Проведение экспериментов по терапевтической эффективности на моделях животных проводили согласно [17]. Белым беспородным крысам-самцам вводили субплантарно в правую заднюю лапу по 0,1 мл адьюванта Фрейнда. Через 14 дней, после развития у крыс вторичной воспалительной реакции ("иммунного" воспаления) на левой лапе, ежедневно в течение 12 дней внутривенно

вводили свободный или НФ индометацин по 1,2 мг/кг. Через 12 дней лечения определяли скорость оседания эритроцитов (СОЭ) как показателя воспаления, а также онкометрию поражённых конечностей.

Профилактическое противовоспалительное действие лекарственных форм индометацина на модели отёка, индуцированного конконавалином А, у мышей. Мышам-самцам линии СВА (по 8 животных в каждой группе) вводили перорально препараты свободного индометацина или его НФ формы в дозах по 0,1, 0,5, 1 и 2 мг/кг в 1% растворе крахмала. Через 20 минут индуцировали острое воспаление введением раствора конконавалина А (Кон А) в подушечку задней стопы. Через 1 час после введения Кон А оценивали массу воспаленной и невоспаленной стоп и рассчитывали индекс реакции воспаления (Ир) как процент ее увеличения.

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).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке показаны изменения концентрации индометацина в крови крыс в течение 2-х часов после перорального введения свободной и нанофосфолипидной (НФ) форм лекарства. Как видно, после введения свободного лекарства наблюдалось его постепенное увеличение его содержания в крови в течение 1 часа – до 2,1 мкг/мл крови. Для индометацина, вводимого в составе НФ-композиции, максимальная концентрация в крови оказалась более чем в 3 раза выше (7,1 мкг/мл), и регистрировалась уже через 15 минут после введения. Сравнение площади под кривой “концентрация-время” (рисунок) свидетельствует о значительном повышении биодоступности для индометацина, вводимого в составе НФ частиц.

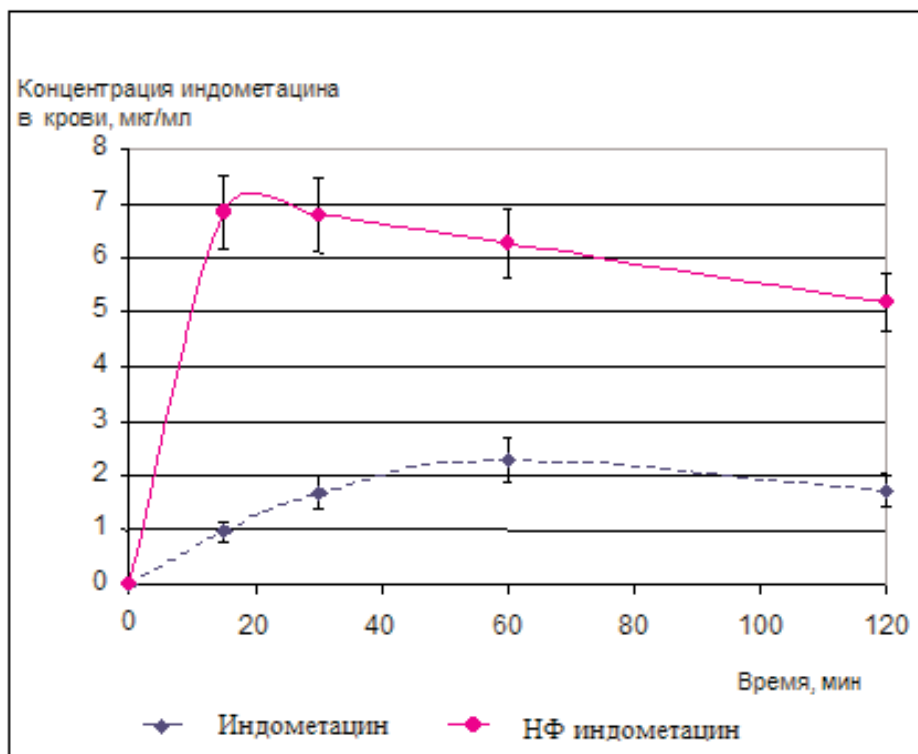


Рисунок.

Содержание индометацина в крови крыс после перорального введения в свободном виде и в виде НФ-индометацина.

ИНДОМЕТАЦИН В ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

Механизм активирующего влияния встраивания индометацина в фосфолипидные наночастицы на увеличение его всасывания в кровь пока не ясен. Основным путём кишечной абсорбции большинства лекарственных и пищевых веществ считают трансклеточное всасывание через энтероцит [15, 18]. Анализ данных последних лет показывает, что такое проникновение повышается со снижением размеров частиц лекарственной формы. [15, 18, 19]. В модельном эксперименте на Сасо-2 клетках нами было показано, что встраивание лекарства в фосфолипидные наночастицы облегчает прохождение индометацина через клеточный монослой [15]. Наблюдаемое повышение биодоступности индометацина (рисунок) позволяет предположить, что лечебный эффект в случае НФ формы может быть достигнут при меньшей дозе лекарства, а, следовательно, снижается вероятность возникновения побочных проявлений. При этом изучение острой и хронической токсичности НФ-индометацина, проводившееся в ОАО Центр по химии лекарственных средств, не показало достоверного отличия его токсикологических характеристик от свободного индометацина (данные не приводятся).

Повышение противовоспалительной активности индометацина при встраивании в фосфолипидные наночастицы, как результат повышения его биодоступности, было продемонстрировано *in vivo* на двух моделях воспаления у экспериментальных животных.

В таблице 1 приведены данные по лечебному действию обеих форм индометацина у крыс с адьювантным артритом. Как видно, при лечении НФ индометацином величина СОЭ, определяемая через 12 дней после начала лечения, была существенно ниже (в среднем 4,3 ед.), чем после введения свободного индометацина (7,3 ед.). Это указывает на более эффективное снижение воспалительного процесса. Первичный отёк (на правой лапе, куда непосредственно вводился адьювант) снижался незначительно, в равной степени для обеих форм лекарства (данные не приведены). Однако процент снижения вторичной иммунологической воспалительной реакции (отёк лапы, куда не вводился индуктор воспаления), в конце эксперимента был почти в 3 раза выше при введении НФ индометацина по сравнению с этим показателем при введении свободного лекарства.

Таблица 1. Противовоспалительное действие нанофосфолипидной композиции индометацина при лечении адьювантного артрита у крыс.

Вводимое лекарство	n	СОЭ*, мм/час	% снижения иммунологической воспалительной реакции**, %
НФ-индометацин	8	4,3±0,8***	9,5±0,1***
Свободный индометацин	8	7,3±1,7	3,2±0,1

Примечание: * - величина СОЭ определялась после 12 дней лечения; до лечения она составляла 12,2±2,1 мм/час; ** - вторичная воспалительная реакция, т.е. степень отёка второй лапы (куда непосредственно не вводился индуктор воспаления); определялась после 12 дней лечения; *** - $p < 0,05$ по сравнению со свободным индометацином.

Преимущество НФ-индометацина проявилось и на другой модели воспаления – индуцированном конконавалином А отёке у мышей (табл. 2). Как видно из таблицы 2, введение свободного индометацина оказывало заметное действие на I_p только при дозах 1 мг/кг и выше. НФ-индометацин уже при дозе 0,5 мг/кг достоверно снижал I_p по сравнению с контролем (в 1,8 раза, $p < 0,05$),

а при дозе 1 мг/кг его действие оказалось достоверно более выраженным, чем для свободной формы (I_p составлял 7,0 и 11,4%, соответственно, $p < 0,05$). Из таблицы 2 также можно видеть, что максимально возможный терапевтический эффект (со средней величиной I_p 7,0-7,8%) достигался для НФ индометацина при вдвое меньшей дозе (1 мг/кг), чем для свободного лекарства (2 мг/кг). Вероятно, это является следствием большей биодоступности лекарства и повышения его концентрации в месте воспаления при его введении в форме НФ композиции (рисунок).

Таблица 2. Противовоспалительное действие индометацина при пероральном введении в свободной форме и в составе НФ композиции на отек, индуцированный конконавалином А у мышей.

Доза препарата (мг/кг)	Индекс реакции воспаления (I_p), %		
	Контроль, без лечения	Свободный индометацин	НФ форма индометацина
0	$18,5 \pm 1,9$	-	-
0,1	-	-	$14,8 \pm 1,6$
0,5	-	$14,9 \pm 1,5$	$10,4 \pm 2,1^*$
1	-	$11,4 \pm 1,0$	$7,0 \pm 1,6^{**}$
2	-	$7,8 \pm 2,1$	$7,7 \pm 2,3$

Примечание. Конконавалин А вводили субплантарно через 20 минут после перорального введения индометацина. Через час животных забивали и по приросту массы лапы, в которую вводили индуктор, определяли I_p . * - $0,05 < p < 0,1$, ** - $p < 0,05$ (по сравнению со свободным индометацином).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, включение индометацина в фосфолипидные наночастицы позволяет получить новую, более эффективную лекарственную форму для перорального введения, с повышенной всасываемостью, биодоступностью и увеличением специфической активности. Включение индометацина в фосфолипидные наночастицы позволяет уменьшать вводимые дозы лекарства на моделях воспаления, что может снизить/устранить риск побочного действия этого эффективного противовоспалительного препарата.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rainsford K.D.* (2007) *Subcell Biochem.*, **42**, 3-27.
2. *Schlansky B., Hwang J.H.* (2009) *J. Gastroenterol.*, **44**, Suppl. 19, 44-52.
3. *Sivalingam N., Pichandi S., Chapla A., Dinakaran A., Jacob M.* (2011) *Eur. J. Pharmacol.*, **654**(1), 106-116.
4. *Ibrahim H.M., Ahmed T.A., Lila A.E., Samy A.M., Kaseem A.A., Nutan M.T.* (2010) *J. Microencapsul.*, **27**(5), 377-386.
5. *Cattani V.B., Fiel L.A., Jäger A., Jäger E., Colomé L.M., Uchoa F., Stefani V., Dalla Costa T., Guterres S.S., Pohlmann A.R.* (2010) *Eur. J. Pharm. Sci.*, **39**(1-3), 116-124.
6. *Kuskov A.N., Voskresenskaya A.A., Goryachaya A.V., Artyukhov A.A., Shtilman M.I., Tsatsakis A.M.* (2010) *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **21**, 1521-1530.

ИНДОМЕТАЦИН В ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

7. *Yuksel N., Baykara M., Shirinzade H., Suzen S.* (2011) *Int. J. Pharm.*, **404**(1-2), 102-109.
8. *Srinath P., Vyas S.P., Diwan P.V.* (2000) *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**(3), 313-321.
9. *Dvir E., Elmann A., Simmons D., Shapiro I., Duvdevani R., Dahan A., Hoffman A., Friedman J.E.* (2007) *CNS Drug Reviews*, **13**(2), 260-277.
10. *Lichtenberger L.M., Barron M., Marathi U.* (2009) *Drugs Today (Barc)*, **45**(12), 877-890.
11. *Zhou Y., Dial E.J., Doyen R., Lichtenberger L.M.* (2010) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **298**(5), G722-G731.
12. *Lichtenberger L.M., Romero J.J., Dial E.J.* (2009) *Br. J. Pharmacol.*, **157**(2), 252-257.
13. *Hartmann P., Szabó A., Eros G., Gurabi D., Horváth G., Németh I., Ghyczy M., Boros M.* (2009) *Eur. J. Pharmacol.*, **622**(1-3), 58-64.
14. *Арчаков А.И., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Проzorovский В.Н., Торховская Т.И., Тихонова Е.Г., Широнин А.В., Санжаков М.А., Воскресенская А.А.* (2009) Заявка на изобретение №2009 139992.
15. *Ипатова О.М., Торховская Т.И., Медведева Н.В., Проzorovский В.Н., Иванова Н.Д., Широнин А.В., Баранова В.С., Арчаков А.И.* (2010) *Биомед. химия*, **56**(1), 101-119.
16. *Ipatova O.M., Prozorovskiy V.N., Medvedeva N.V., Shironin A.V., Strekalova O.S., Ivanova N.D., Torkhovskaya T.I., Archakov A.I.* (2010) *Europ. Congress for Drug Discovery (MipTec)*, Basel, abs. 80.
17. *Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д.* (2005) *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, ред. Р.У. Хабриев. М., 695-708.
18. *Pouton C.W., Porter C.J.* (2008) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**(6), 625-637.
19. *Catalioto R.M., Maggi C.A., Giuliani S.* (2011) *Curr. Med. Chem.*, **18**(3), 398-426.

Поступила: 12. 04. 2011.

THE INCREASE OF BIOAVAILABILITY AND ANTIINFLAMMATORY EFFECT OF INDOMETHACIN INCLUDED INTO PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES

A.V. Shironin, O.M. Ipatova, N.V. Medvedeva, V.N. Prozorovskiy, E.G. Tikhonova, T.S. Zakharova, M.A. Sanzhakov, T.I. Torkhovskaya

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; e-mail: torti@mail.ru

The ultrafine formulation on the base of plant phosphatidylcholine and antiinflammatory remedy indomethacin with nanoparticles less than 50 nm was obtained. Drug bioavailability after its peroral administration to rats was more than 2 fold higher as compared with free indomethacin. Increased antiinflammatory activity of indomethacin in phospholipids nanoparticles as compared with its free form was shown in two models of inflammation - adjuvant arthritis in rats and concanavalin A induced edema in mice. The increased bioavailability of indomethacin after administration of its phospholipid formulation allows to decrease a dose for achievement of therapeutic effect, that reduces risks of occurrence of collateral displays.

Key words: indomethacin, phospholipids nanoparticles, absorption, concanavalin A, antiinflammatory action.