

Модификация фармакокинетики наночастиц сурфактантом

*А. Б. Еслямханов, И. Н. Скидан, С. Э. Гельперина,
Т. Н. Скидан, А. Е. Гуляев*

Казахстанский медицинский институт, Алматы, Казахстан

Наночастицы являются перспективной транспортной формой для ряда лекарственных препаратов, в том числе и фотосенсибилизаторов, предназначенных для фотодинамической терапии рака. В статье приводятся результаты попытки изменения типичной фармакокинетики фотосенсибилизатора (Фотосенс), ассоциированного с наночастицами поли-н-бутилцианоакрилата при обработке наночастиц сурфактантом плуроник F68. Эксперименты проведены на 52 белых неинбредных крысах. Препараты вводили однократно в хвостовую вену крыс в дозе 15 мг/кг. Под влиянием сурфактанта существенно меняется фармакокинетика фотосенсибилизатора. Продлевается время циркуляции препарата в крови крыс, существенно снижается накопление фотосенсибилизатора в органах, содержащих большое количество макрофагальных элементов, главным образом в печени и селезенке — основных органах-мишенях наночастиц. Можно констатировать существенное перераспределение фотосенсибилизатора, вводимого в составе модифицированных наночастиц, в организме крыс.

ВВЕДЕНИЕ

Доказательства преимущественного накопления наночастиц (НЧ) в тканях, содержащих большое количество макрофагальных элементов — системе мононуклеарных фагоцитов (СМФ), можно найти в многочисленных работах. Так, например, классическое распределение НЧ в организме у крыс выглядит по J. Kreuter [1] следующим образом: в печени находится 60 — 90 %, в селезенке 2 — 10 %, в легких 3 — 20 %, в костном мозге — менее 1 % от введенной дозы частиц.

Поскольку прогностическая ценность экспериментальных исследований во многом совпадает с той картиной, которая наблюдается в клинике, то можно предположить, что высокое депонирование НЧ в печени или других органах СМФ может существенно ограничить возможность их клинического применения и приводить к усилению токсичности ассоциированных с НЧ лекарственных соединений. С другой стороны, показано, что захвату НЧ клетками предшествует процесс опсонизации, т.е. адсорбции белков крови на поверхности частиц. Одним из способов снижения адсорбции белков является покрытие (модификация) поверхности НЧ поверхностно-активными веществами (ПАВ), в результате чего достигается, так называемая, «стерическая» стабилизация частиц [2]. Стерическая стабилизация способствует повышению стабильности и времени циркуляции, а также регулированию распределения НЧ в организме.

В этой связи представилась возможность целенаправленно изменить фармакокинетику НЧ в организме крыс путем модификации их поверхности биосовместимым ПАВ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Фотосенс (ФС) представляет собой смесь определенного состава натриевых солей ди-, три- и тетрасульфопроизводных фталоцианина алюминия. (препарат синтезирован и любезно предоставлен д. х. н. Е.А. Лукьянцом и к. х. н. В.М. Дергачевой, ГНЦ РФ «НИОПИК», Москва). Для включения ФС в наночастицы использовали модифицированный метод P. Couvreur [3]. Средний размер частиц, определенный методом лазерного светорассеяния (Nano-sizer N4MD, Coulter Electronics, U.K.), составлял 300 нм. Степень включения ФС в частицы рассчитывали как отношение разности между исходной концентрацией в реакционной смеси и концентрацией свободного вещества в супернатанте к исходной концентрации. Концентрацию свободного ФС определяли спектрофлуориметрическим методом (Spectrofluorimeter FP-550 Jasco, Japan) в супернатанте после осаждения НЧ центрифугированием при скорости 40000 об/мин в течение 40 мин (Ultracentrifuge L8-60M Beckman, U.S.A.). Степень включения ФС составляла 70 %.

Для модификации поверхности НЧ использовали плуроник F-68 (П-68). Модификацию поверхности

НЧ плуороником F-68 осуществляли следующим образом: к водной суспензии НЧ, содержащих препарат добавляли П-68 до конечной концентрации 1 %. Смесь выдерживали в термостате при 37°C 30 минут, после чего НЧ вводили экспериментальным животным.

Опыты проведены на 52 белых неинбредных крысах самцах массой 180-230 г (питомник Казахского медицинского института (Алматы) и РАМН «Крюково»). Препараты вводили однократно в хвостовую вену крыс в дозе 15 мг/кг. В опыт были включены 2 группы животных по 5 особей в каждой. Крысы первой группы получали Фотосенс, ассоциированный с наночастицами (ФЦ-НЧ). Животные второй группы получали Фотосенс, ассоциированный с наночастицами в присутствии 1 % плуороника F-68 (ФЦ-НЧ+П68). Через 10 мин; 0,5; 1; 3; 6; 9; 15; 24 и 48 ч опытных животных умерщвляли путем декапитации. В опыте изучали кинетику распределения ФЦ-НЧ и ФЦ-НЧ+П68 в крови, печени, легких, селезенке, почках, мышечной ткани, коже, сердце и головном мозге. Образцы печени для исследования брали во всех случаях из края левой латеральной доли. Также для исследования брали правое полушарие головного мозга. Лоскут кожи вырезали со спины, а мышечную ткань из задней конечности — четырехглавую мышцу бедра. Остальные органы для гомогенизации — правую почку, легкие, сердце, селезенку в опыте использовали полностью. Органы отделяли, промывали фосфатно-солевым буфером (рН 7,2), взвешивали, прибавляли 3 мл 1 % раствора додецилсульфата натрия (Serva) и гомогенизировали. В гомогенат ткани добавляли 7 мл того же раствора, инкубировали 60 мин при 37°C и центрифугировали 30 мин при скорости 5000 об/мин. Из супернатанта отбирали 250 мкл гомогената ткани или 50 мкл плазмы крови и доводили объем пробы до 3 мл смесью диметилформамид — ацетон (1:1) для растворения частиц. Концентрацию ФС определяли спектрофлуориметрическим методом (Spectrofluorimeter FP-550 Jasco, Япония) при длине волны возбуждения 680 нм и длине волны испускания 685 нм.

Для характеристики фармакокинетики препаратов в крови и органах крыс рассчитывали интегральный показатель — площадь под фармакокинетической кривой (AUC). Для характеристики эффективности про-

никновения препаратов из крови в ткань рассчитывали коэффициент тканевой доступности f как отношение AUC данной ткани к AUC крови [4]. Расчеты проводили по программе FARM (Л. Е. Холодов, В. В. Дорохов, 1989). Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В начальной фазе распределения (α -фазе) уровень ФЦ-НЧ+П68 в крови был в 1,2-1,7 раза выше уровня препарата сравнения (ФЦ-НЧ). В промежутке между 9 и 15 часами не установлено достоверной разницы между исследуемыми вариантами Фотосенса. Через сутки после введения концентрация ФЦ-НЧ+П68 была выше концентрации ФЦ-НЧ более чем в 2 раза ($p < 0,05$). К исходу вторых суток уровень ФЦ-НЧ+П68 превышал уровень ФЦ-НЧ примерно в 5 раз ($p < 0,05$). В таблице 1 представлены значения площади под фармакокинетической кривой.

Как видно, интегральный показатель (AUC) в сыворотке крови у ФЦ-НЧ+П68 возрос в среднем на 23,3 % по сравнению с аналогичным показателем ФЦ-НЧ.

При изучении топографической фармакокинетики ФЦ-НЧ+П68 нами целенаправленно выбраны органы с хорошим кровоснабжением или высоким содержанием макрофагальных элементов — печень, легкие, селезенка и почки. Другую группу представляли органы со слабым кровоснабжением или для которых в норме нетипично большое скопление макрофагальных элементов — сердце, мышечная ткань, кожа или головной мозг.

Для печени установлено резкое снижение уровня ФЦ-НЧ+П68 на всем отрезке фармакокинетической кривой. В первый час после введения разница составляла в среднем 1,9-2,6 раза ($p < 0,05$). Через сутки после введения установлено среднее снижение уровня ФЦ-НЧ+П68 примерно на 45 % по сравнению с ФЦ-НЧ. В конечной точке измерения, т.е. через 48 часов уровень ФЦ-НЧ+П68 в печени был ниже уровня ФЦ-НЧ в 2,6 раза ($p < 0,05$). Площадь под фармакокинетической кривой уменьшилась с $735,0 \pm 34,00$ до $620,0 \pm 41,0$.

Таблица 1.

Площадь под фармакокинетической кривой фармакологического соединения фотосенс, ассоциированного с наночастицами (ФЦ-НЧ) и модифицированного плуороником F-68 (ФЦ-НЧ+П68)

Орган / ткань	Численное значение параметра AUC, конц. * час	
	ФЦ-НЧ	ФЦ-НЧ+П68
Сыворотка крови	$202,0 \pm 5,0$	$249,0 \pm 2,0^*$
Печень	$735,0 \pm 34,00$	$620,0 \pm 41,0$
Легкие	$155,0 \pm 7,00$	$162,0 \pm 15,0$
Селезенка	$446,0 \pm 55,0$	$221,0 \pm 38,0^*$
Почки	$406,0 \pm 80,0$	$535,0 \pm 43,0^*$
Сердце	$19,6 \pm 0,3$	$18,7 \pm 0,2$
Скелетные мышцы	$6,05 \pm 0,11$	$2,55 \pm 0,44^*$
Кожа	$42,7 \pm 1,3$	$101,4 \pm 4,0^*$
Головной мозг	$9,06 \pm 3,77$	$5,1 \pm 4,0$

Примечание: * — $p < 0,05$

В селезенке в течение 15 часов уровень ФЦ-НЧ+П68 был ниже в среднем в 1,6-4,3 раза уровня препарата сравнения ($p<0,05$). Через 48 ч после введения установить достоверную разницу между значениями концентраций препаратов в селезенке крыс не удалось. Интегральный параметр (AUC) у ФЦ-НЧ+П68 оказался примерно в 2 раза ниже, чем у варианта сравнения.

В ткани легких уровень концентрации ФЦ-НЧ+П68 в первый час после введения был достоверно выше уровня ФЦ-НЧ в среднем в 1,4-1,9 раза ($p<0,05$). Со временем картина распределения модифицированных наночастиц в легких менялась в сторону снижения уровня концентрации. На терминальном отрезке фармакокинетической кривой между 15 и 48 часами не удалось установить достоверной разницы между ФЦ-НЧ+П68 и ФЦ-НЧ. Не наблюдалась достоверная разница и между AUC.

В течение первого часа после введения уровень ФЦ-НЧ+П68 в гомогенате ткани почек был в среднем в 1,5-2,3 раза выше уровня варианта сравнения ($p<0,05$). Через 3 часа после введения концентрации препаратов выравнивались и достоверно не отличались друг от друга. В промежутке между 9 и 15 часами включительно не было выявлено достоверной разницы между числовыми значениями концентраций вариантов фотосенсибилизатора. На терминальном участке фармакокинетической кривой (24 часа) уровень ФЦ-НЧ+П68 был в 2,4 раза выше уровня варианта сравнения ($p<0,05$). В последней точке измерения (48 часов) разница между исследуемыми вариантами фотосенсибилизатора нивелировалась, а числовые значения концентраций достоверно не отличались друг от друга. Интегральный параметр (AUC) у ФЦ-НЧ+П68 был более чем на 30 % выше (AUC) варианта сравнения.

В ткани сердца в течение 9 часов средние уровни используемых в работе вариантов фотосенсибилизатора достоверно не отличались друг от друга. На терминальном отрезке фармакокинетической кривой в промежутке между 15 и 24 часами уровень ФЦ-НЧ+П68 был в среднем в 2,1-4,2 раза выше уровня ФЦ-НЧ ($p<0,05$). Через двое суток после введения условия опыта позволяли измерить лишь минимально определяемые уровни ФЦ-НЧ+П68. Значения AUC модифицированных и обычных наночастиц существенно не различались.

В скелетных мышцах оба варианта фотосенсибилизатора накапливаются в минимальных количествах. В течение первых 30 минут уровень ФЦ-НЧ+П68 был ниже в среднем в 2,9-4,4 раза уровня варианта сравнения ($p<0,05$). В интервале между 3 и 6 часами наблюдалось также достоверное снижение в среднем в 2,1-5,9 раза ФЦ-НЧ+П68. После 9 часов установить достоверность различий между числовыми значениями концентраций не удалось. Среднее значение AUC

у ФЦ-НЧ+П68 было более чем в 2 раза ниже аналогичного показателя ФЦ-НЧ.

Уровень концентрации ФЦ-НЧ+П68 в коже был в среднем в 1,2-2,6 раза выше уровня ФЦ-НЧ. Через двое суток удалось определить лишь ФЦ-НЧ+П68. Среднее значение показателя AUC ФЦ-НЧ+П68 было в 2,4 раза выше аналогичного значения для варианта сравнения ($42,7\pm1,3 - 101,4\pm4,0$ $p<0,05$).

Уровни ФЦ-НЧ+П68 определялись в головном мозге крыс в течение 6 часов от момента введения. При этом на максимуме концентрация фотосенсибилизатора не превышала 0,5 мкг/г. Столь низкие концентрации Фотосенса, определяемого нами в гомогенате головного мозга, не позволяют с полной уверенностью утверждать, что препарат доставлялся в мозг с помощью наночастиц. Следует подчеркнуть, что исследуемый вариант фотосенсибилизатора находился как в связанном с наночастицами состоянии, так и содержалось небольшое количество соединения в свободном состоянии. Не исключено, что те минимальные количества фотосенсибилизатора, определенные в мозге крыс, могли обнаруживаться за счет несвязанного с наночастицами соединения.

Рассчитывался коэффициент перехода (f) ФЦ-НЧ или ФЦ-НЧ+П68 из крови в органы (рис. 1).

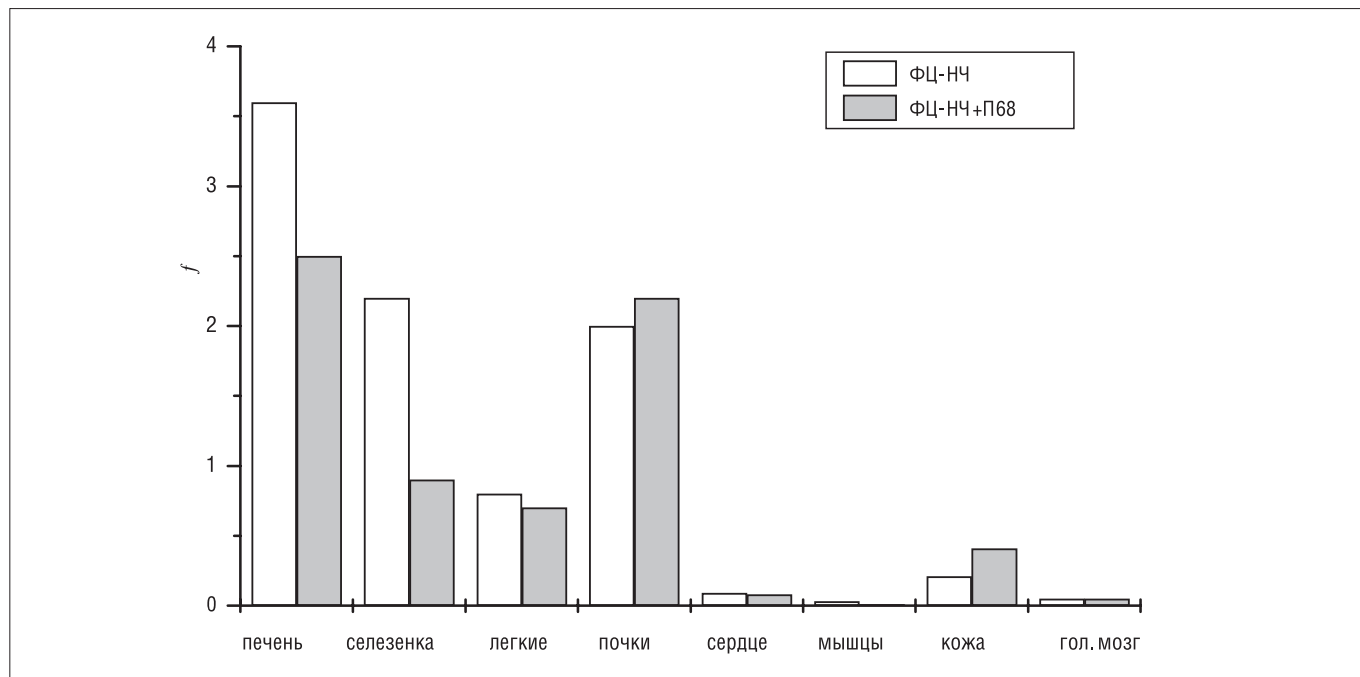
Как видно, наблюдается снижение показателя f в среднем в 1,4 раза для печени, в 2,5 раза — для селезенки, в 1,2 раза — для легких, в 3 раза — для мышечной ткани, в 1,3 раза — для сердца и в 2,5 раза — для головного мозга. Повышение показателя f определено в среднем на 7,5 % для почек и на 95 % для кожи.

Таким образом, изменение свойств поверхности наночастиц из поли-н-бутилцианоакрилата существенно отразилось на кинетике распределения фотосенсибилизатора в организме крыс. Было установлено, что ПАВ продлевает время циркуляции препарата в крови крыс. Особенно хорошо это заметно на начальном отрезке фармакокинетической кривой (α -фазе). Другим результатом модификации наночастиц было существенное снижение фотосенсибилизатора в органах, содержащих большое количество макрофагальных элементов, главным образом в печени и селезенке — основных органах мишенях наночастиц.

Резюмируя вышеизложенное, можно констатировать существенное перераспределение фотосенсибилизатора, вводимого в составе модифицированных наночастиц, в организме крыс что, разумеется, не является исключительной особенностью наших экспериментов. В подтверждении этому можно привести многочисленные примеры соответствующих исследований [5, 6]. Однако в целом, нами впервые установлен данный феномен для препарата, предназначенного для фотодинамической терапии рака.

Рис. 1.

Коэффициент f перехода фотосенсибилизатора, введенного в составе модифицированных наночастиц, из крови в органы



ЛИТЕРАТУРА

1. Kreuter J. Colloidal drug delivery systems. N. Y.: Marcel Dekker Inc 1994; 352.
2. Торчилин В. П., Трубецкой В. С. Полимеры на поверхности наночастиц: регулирование свойств носителей и их биораспределения. Высокомолекулярные соединения 1994; 36: 11: 1880-1893.
3. Couvreur P., Kante B., Roland M. et al. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. J Pharm Pharmacol 1979; 31: 331-332.
4. Мануйлов К. К., Кашина Л. Б. Новый метод расчета коэффициента распределения ткань-кровь для физиологических моделей фармакокинетики. Антибиотики и химиотерапия 1990; 5: 35-36.
5. Allemann E., Brasseur N., Benrezzak G., Rousseau J., Kudrevich SV., Boyle RW., Leroux JC., Gurny R., Van — Lier J. E. PEG-coated poly (lactic acid) nanoparticles for the delivery of hexadecafluor zinc phthalocyanine to EMT-6 mouse mammary tumours. J Pharm Pharmacol 1995; 5: 47: 382-387.
6. Moghimi M. S., Hunter C. A., Murray C. J. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles. Theory to Practice 2001; 53: Issue 2: 283-318.