

И. А. Кравченко, В. Б. Ларионов, А. И. Александрова, Н. В. Овчаренко,
А. А. Полищук, С. А. Андронати

ВЛИЯНИЕ УСИЛИТЕЛЕЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ КОЖИ НА ТРАНСДЕРМАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ФЕНАЗЕПАМА *IN VITRO*

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова;
Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса

Возрастающий интерес к проблеме трансдермальных терапевтических форм лекарственных препаратов обусловлен такими их преимуществами, как способность пролонгировать действие включенного в них активного компонента, стабилизировать его концентрацию в крови на постоянном уровне, в результате чего достигается длительный стационарный фармакологический эффект, а побочные эффекты выражены в гораздо меньшей степени [1].

Для создания нужной концентрации лекарственного вещества в организме необходимо, чтобы оно в достаточном количестве проникало через роговой слой эпидермиса, являющегося основным препятствием при проникновении чужеродных веществ через кожу. Большинство лекарственных веществ не могут в необходимом количестве проникнуть через кожу и тогда появляется необходимость в обратимом изменении барьерных свойств рогового слоя. В связи с этим в последнее время уделяется большое внимание проблеме изучения как усилителей проницаемости, способных обратимо увеличивать проницаемость кожи, так и исследованию механизма их действия [2].

Целью данной работы было изучение влияния некоторых усилителей проницаемости кожи на трансдермальное введение феназепама *in vitro*.

Материалы и методы

¹⁴C-Феназепама ($3,7 \cdot 10^9$ Бк) был синтезирован в отделе биологически активных веществ Физико-химического института им. А. В. Богатского НАН Украины.

Образцы рогового слоя крыс получены при обработке кожи (отделенной от подлежащих тканей и жировой клетчатки) раствором трипсина (0,1 %) в фосфатно-солевом буфере (0,149 М NaCl, 2 мМ КН₂Р₀₄, рН = 7,4) в течение 24 ч при 0 – 5 °С и затем 2 ч при 37 °С. Роговой слой отделяли от подлежащих слоев, дважды промывали в растворе ингибитора трипсина (0,1 %) и в дистиллированной воде, сушили при температуре 24 °С и относительной влажности 75 % [3].

Для ИК-спектроскопии образцы рогового слоя размером 3×3 см² вымачивали в растворе усилителя проницаемости (0,16 М, 0,5 мл) в 1,2-пропиленгликоле в течение 24 ч (внешней стороной к раствору); по прошествии указанного времени образцы отжимали между слоями фильтровальной бумаги до удаления следов раствора [3, 4]. ИК-спектры каждого образца рогового слоя были сняты дважды: до и после обработки усилителями проницаемости кожи на приборе

FTIR-8300 (Shimadzu). Спектры были обработаны с помощью программы Shimadzu Hyper IR.

Каждый образец подвергался обработке 10 % раствором усилителя проницаемости в 1,2-пропиленгликоле в течение 24 ч.

При изучении проницаемости образцы рогового слоя предварительно вымачивали в растворе NaCl (0,9 %) в течение 1 ч, а затем помещали в качестве мембраны в вертикальные диффузионные ячейки Франца (внешней стороной к донорной среде), акцепторная среда состояла из натрий-фосфатного буфера (рН = 7,4), содержащего 5 % полиэтиленгликоля (ПЭО-400). Донорная фаза представляла собой гель, состоящий из поливинилового спирта и 1,2-пропиленгликоля (1:1:1,5), содержащий ¹⁴C-феназепама и 10 % усилителя проницаемости, который наносили на внешнюю поверхность рогового слоя на 21 ч. Ячейки термостатировали при $t = 35 \pm 0,5$ °С, затем определяли количество проникшего в акцепторную среду ¹⁴C-феназепама методом жидкостной сцинтилляционной фотометрии. Скорость диффузии феназепама через роговой слой определяли по формуле $V = Q/tS$, где V — скорость диффузии феназепама через роговой слой, Q — количество (мкг) препарата, проникшее за время t , S — площадь мембраны, см².

Степень экстракции липидов рогового слоя определяли гравиметрически по разности образцов рогового слоя, обработанного раствором усилителей проницаемости (10 %) в 1,2-пропиленгликоле. Через 24 ч инкубации при 35 °С раствор удаляли, роговой слой трижды промывали дистиллированной водой, сушили 48 ч над Р₂О₅.

Содержание экстрагированного холестерина определяли по реакции Либермана – Бурхарда. К 0,2 мл раствора липидов в 1,2-пропиленгликоле добавляли 2,5 мл уксусного ангидрида (х.ч.), и при 10 °С, 0,5 мл Н₂SO₄. Пробы выдерживали 15 мин в темноте и фотометрировали при 656 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм. Количество холестерина в пробе определяли по калибровочному графику (50 – 500 мкг).

Результаты и их обсуждение

Как уже отмечалось, ведущая роль в создании барьерных функций кожи принадлежит роговому слою, препятствующему проникновению ксенобиотиков через кожу в организм. Он же является и основным местом действия усилителей чрезкожной проницаемости, обратимо изменяющих его барьерную функцию [2].

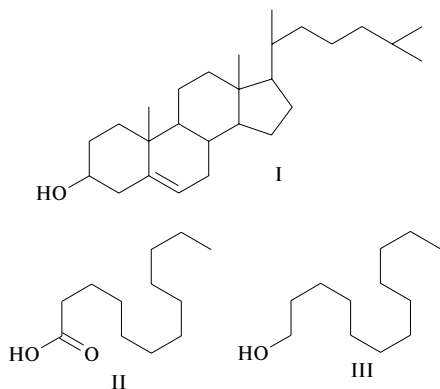


Рис. 1. Структура холестерина (I), и холестериноподобные конформации лауриновой кислоты (II) и додеканола (III).

Морфологически роговой слой представляет собой клетки (кератиноциты), погруженные в межклеточный матрикс. Интерцеллюлярные липиды в роговом слое упорядочены в виде многочисленных бислойных структур, образующих полярные и неполярные области [5, 6].

Увеличения проницаемости рогового слоя можно достичь, способствуя диффузии молекул лекарственного вещества через бислойные липидные мембраны клеток, увеличивая растворимость его в межклеточном матриксе или уменьшая его взаимодействие с белками рогового слоя.

Таблица 1
Влияние усилителей проницаемости на коэффициент диффузии 2^{14}C -феназепама ($3,7 \cdot 10^9$ Бк) через роговой слой *in vitro* ($M \pm m, n = 6, p \leq 0,05$).

Усилитель	Скорость диффузии, мкг/ч/см ²	Степень экстракции, %	
		Липиды	Холестерин
Контроль	0,36 ± 0,09	67,2 ± 2,3	52,89 ± 2,67
ДМСО	0,72 ± 0,08	96,4 ± 2,1	35,54 ± 1,2
ДМФА	0,44 ± 0,13	63,4 ± 2,2	56,36 ± 3,16
Кислоты			
Энантовая	0,83 ± 0,25	—	—
Каприновая	1,24 ± 0,12	—	—
Лауриновая	1,92 ± 0,11	—	—
Тридекановая	1,72 ± 0,22	—	—
Миристиновая	1,67 ± 0,17	—	—
Пальмитиновая	0,86 ± 0,08	—	—
Стеариновая	0,61 ± 0,08	—	—
Вокозановая	0,42 ± 0,11	—	—
Спирты			
Метанол	0,93 ± 0,37	68,0 ± 1,4	62,56 ± 1,71
Этанол	0,94 ± 0,15	72,7 ± 1,5	70,74 ± 3,26
Пропанол-2	0,91 ± 0,14	62,2 ± 1,8	70,49 ± 1,36
Бутанол	0,95 ± 0,17	62,2 ± 1,1	69,00 ± 2,17
Пентанол	1,04 ± 0,34	70,9 ± 1,4	65,78 ± 1,25
Октанол	1,39 ± 0,26	—	—
Додеканол	1,00 ± 0,05	—	—
Тридеканол	1,36 ± 0,18	—	—
Тетрадеканол	1,16 ± 0,17	—	—

Увеличение диффузии молекул препарата через бислойные мембраны отмечается при нарушении упаковки алкильных цепей липидов, в результате чего увеличивается локальная текучесть плазматических мембран [3, 7]. Подобный эффект может быть достигнут, в частности, введением в состав липидов, формирующих мембраны, соединений, содержащих длинные алкильные радикалы, таких как алифатические кислоты или спирты. Учитывая, что феназепам является липофильным соединением, наиболее вероятным путем проникновения через роговой слой является диффузия его молекул через липофильные регионы липидов мембран и липиды интерцеллюлярного матрикса. Таким образом, использование указанных усилителей проницаемости для увеличения трансдермального потока феназепама является наиболее приемлемым.

Количественно изменение проницаемости рогового слоя под действием алифатических кислот и спиртов оценивали по изменению скорости проникновения ^{14}C -феназепама через роговой слой. Как видно из представленных данных (табл. 1), при использовании в качестве усилителей проницаемости алифатических кислот и спиртов происходит значительное (~ на порядок) увеличение скорости проникновения ^{14}C -феназепама. В случае алифатических кислот изменение скорости проникновения параболически зависит от количества атомов углерода в алкильной цепи, при этом наибольшим усиливающим действием обладает лауриновая кислота. По-видимому, кислоты с числом атомов углерода в радикале меньше 11 в недостаточной степени вызывают нарушение упаковки алкильных радикалов липидов, тогда как увеличение количества атомов углерода в радикале жирной кислоты приводит к уменьшению ее растворимости в пропиленгликоле, вследствие чего уменьшается степень проникновения кислот в липидные бислои рогового слоя и, следовательно, уменьшается степень их разупорядочения.

Известно, что при использовании низших алифатических спиртов преимущественным механизмом усиления проницаемости кожи является накопление их в межклеточном матриксе, в результате чего раствори-

Таблица 2
Зависимость интенсивности и площади пика ИК-спектров поглощения рогового слоя при $2840 - 2920 \text{ см}^{-1}$ от обработки усилителями проницаемости

Усилитель	Интенсивность, I		Площадь пика	
	До обработки	После обработки	До обработки	После обработки
ПГ	3,18 ± 0,45**	3,87 ± 0,16**	188,8 ± 10,6**	127,4 ± 1,76**
Лауриновая кислота	1,91 ± 0,27*	2,87 ± 0,01*	574,4 ± 64,8*	818,6 ± 214,6*
	2,27 ± 0,49**	4,78 ± 0,95**	133,1 ± 10,1**	149,7 ± 3,7**
Додеканол	2,04 ± 0,2*	2,31 ± 0,11*	144,7 ± 9,2*	659,1 ± 136,9*
	2,39 ± 0,44**	2,81 ± 0,47**	404,1 ± 20,3**	174,1 ± 11,9**

* максимум полосы поглощения — 2848 см^{-1} ;
** максимум полосы поглощения — 2918 см^{-1} .

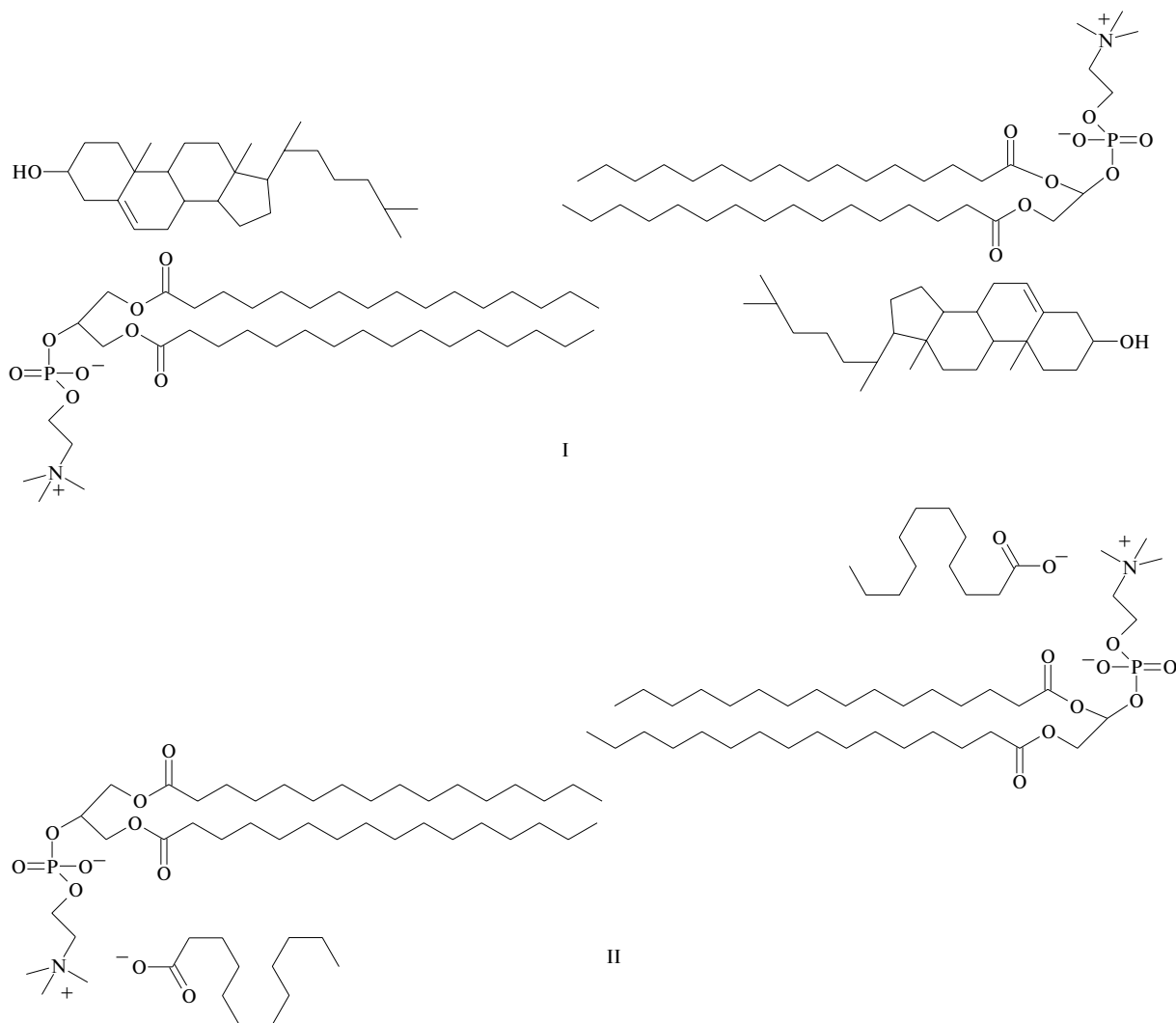


Рис. 2. Молекулярная модель структуры липидных мембран, содержащих холестерин (I) и лауриновую кислоту (II).

мость проникающего вещества в нем увеличивается, при этом облегчается диффузия препарата сквозь интерцеллюлярное пространство. Увеличение микрогущести липидных бислоев в данном случае достигается за счет частичной экстракции липидов [8]. Нами установлено, что, наряду со степенью экстракции липидов, содержание холестерина в роговом слое и степень его экстракции при обработке кожи усилителями проницаемости, также является важным показателем диффузии феназепам через кожу (табл. 1). Смеси “холестерин – фосфолипид” занимают промежуточное по упорядоченности положение между гелевой и жидкокристаллической фазами, так как, присутствуя в липидных мембранах, холестерин затрудняет (в состоянии геля) оптимальную упаковку алкильных цепей фосфолипидов, а в жидкокристаллическом состоянии ограничивает их конформационную подвижность. Таким образом, в результате экстракции находящегося в роговом слое холестерина (и части липидов), а также замещения его молекулами растворителя, большая часть липидов мембран переходит в жидкокристаллическое состояние, а малый размер молекул раствори-

теля не препятствует конформационным изменениям алкильных цепей.

Через 24 ч экспозиции пропиленгликолем из рогового слоя экстрагируется ~ 50 % находящегося в нем холестерина (общее содержание холестерина в роговом слое составляет 23,6 % от общего содержания липидов) (табл. 1). В присутствии спиртов количество экстрагируемого холестерина возрастает на 10 – 20 %, при неизменном общем количестве экстрагированных липидов, тогда как в случае ДМСО оно снижается до 35 %. Вероятно, увеличение проницаемости рогового слоя под действием низших спиртов объясняется экстракцией холестерина из мембран, увеличением растворимости проникающего вещества в межклеточном матриксе и накоплением молекул алифатического спирта в гидрофобных регионах липидных мембран.

Увеличение проницаемости рогового слоя под воздействием высших жирных кислот и спиртов может быть связано также с тем, что они могут существовать в пространственной форме, при которой конформация углеводородного радикала сходна с конформацией холестеринного скелета (рис. 1). Как и холестерин, в этой форме кислоты и спирты могут влиять на упаков-

Зависимость интенсивности и площади пика ИК-спектров поглощения рогового слоя при 3280 см^{-1} от обработки усилителями проницаемости.

Усилитель	Интенсивность, I		Площадь пика	
	До обработки	После обработки	До обработки	После обработки
ПГ	$3,64 \pm 0,15$	$3,88 \pm 0,24$	$182,21 \pm 4,24$	$930,15 \pm 4,77$
Лауриновая кислота	$2,71 \pm 1,12$	$3,57 \pm 0,96$	$1027,08 \pm 256,77$	$1528,76 \pm 380,19$
Додеканол	$2,84 \pm 0,01$	$3,92 \pm 0,16$	$404,08 \pm 20,04$	$520,89 \pm 12,57$

Зависимость интенсивности и площади пика ИК-спектров поглощения рогового слоя при $1540 - 1660 \text{ см}^{-1}$ от обработки усилителями проницаемости

Усилитель	Интенсивность, I		Площадь пика	
	До обработки	После обработки	До обработки	После обработки
ПГ	$2,82 \pm 1,01^*$	$2,98 \pm 0,42^*$	$232,1 \pm 48,4^*$	$54,2 \pm 4,8^*$
	$3,97 \pm 0,49^{**}$	$2,95 \pm 0,23^{**}$	$165,8 \pm 3,8^{**}$	$48,2 \pm 2,2^{**}$
Лауриновая кислота	$2,81 \pm 1,01^*$	$2,98 \pm 0,41^*$	$232,1 \pm 48,4^*$	$54,15 \pm 4,78^*$
	$3,94 \pm 0,49^{**}$	$2,95 \pm 0,23^{**}$	$165,8 \pm 3,8^{**}$	$49,27 \pm 2,16^{**}$
Додеканол	$2,86 \pm 0,89^*$	$2,42 \pm 0,28^*$	$245,3 \pm 42,1^*$	$130,6 \pm 8,4^*$
	$4,03 \pm 0,75^{**}$	$3,26 \pm 0,02^{**}$	$166,1 \pm 0,9^{**}$	$151,5 \pm 19,7^{**}$

* максимум полосы поглощения — 1541 см^{-1} ;
** максимум полосы поглощения — 1649 см^{-1} .

ку алкильных цепей в липидных мембранах, вызывая нарушение их оптимальной упаковки в гелевой фазе. В то же время, в жидкокристаллической фазе они не препятствуют конформационной подвижности алкильных цепей, чем и объясняется увеличение проницаемости рогового слоя. Такое расположение может быть реализовано в случае лауриновой кислоты (рис. 2).

Структуру мембран в кератиноцитах можно контролировать с помощью ИК-спектроскопии, при этом изменения в интенсивности полос поглощения C–H групп в ИК-спектрах образцов рогового слоя (симметричные и антисимметричные колебания C–H-связей при 2850 и 2918 см^{-1}) связаны с увеличением свободы и подвижности углеводородных цепей интерцеллюлярных липидов [4, 6, 7]. Подобное нарушение порядка упаковки алкильных цепей часто происходит за счет увеличения микротекучести мембран. При обработке рогового слоя лауриновой кислотой (табл. 2) отмечается флюидизация липидов мембран, определяемая по увеличению площади и интенсивности пиков валентных колебаний CH_2 -групп [6].

Так как влияние лауриновой кислоты на липиды рогового слоя определяется, в основном, длиной ее углеводородного радикала, очевидно, что соединения подобной структуры также должны вызывать увеличение микротекучести бислоевых мембран. Наибольший интерес представляет исследование высших алифатических спиртов, так как в изученной нами литературе не обнаружено экспериментальных

данных по изучению их влияния на роговой слой. В спектрах рогового слоя, обработанного высшими алифатическими спиртами, наблюдается увеличение интенсивности поглощения в области 2850 и 2920 см^{-1} , однако эти изменения меньше, чем при использовании лауриновой кислоты (табл. 2).

Степень гидратации рогового слоя также влияет на его проницаемость для чужеродных соединений, при этом увеличение гидратации способствует усилению трансдермального проникновения для большинства соединений [5, 6]. ИК-спектры рогового слоя содержат полосы поглощения валентных колебаний OH-групп молекул воды, связанных водородными связями, в области $2800 - 3400 \text{ см}^{-1}$. Анализ данных ИК-спектров позволяет констатировать, что обработка рогового слоя указанными усилителями проницаемости приводит к увеличению гидратации рогового слоя, характеризующейся увеличением площади пиков и их интенсивности (табл. 3); гидратация рогового слоя, обработанного высшими алифатическими спиртами (и, в частности, тетрадеканолом), больше, чем обработанного лауриновой кислотой.

Обработка рогового слоя как чистым пропиленгликолем, так и в сочетании с лауриновой кислотой или высшими алифатическими спиртами, приводит также к изменению конформации протеинов рогового слоя (табл. 4). Белки рогового слоя имеют валентные колебания амид I и амид II при 1640 и 1550 см^{-1} . Связи амид I обусловлены C=O-валентными колебаниями, а амид II — C–N-валентными и N–H-колебаниями изги-

ба [9]. В роговом слое, обработанном высшими спиртами, наблюдается существенное снижение высоты и площади пиков, что также свидетельствует об изменении белков после обработки (табл. 4). Следует отметить, что уменьшение интенсивности и площади пиков в спектрах рогового слоя, обработанного лауриновой кислотой, гораздо более выраженное, чем при использовании высших алифатических спиртов, что, вероятно, связано с тем, что лауриновая кислота в большей степени оказывает влияние на белки рогового слоя [10].

Таким образом исследованиями *in vitro* показано, что для усиления трансдермального проникновения феназепам целесобразно использование жирных кислот и спиртов с длиной алкильной цепи — C_{11} - C_{13} , из низших спиртов — пентанол, а также ДМСО.

Методами ИК-спектроскопии показано влияние спиртов, жирных кислот, а также пропиленгликоля на липиды и белки рогового слоя, а также на его гидратацию.

Использование низших алифатических спиртов и ДМСО, в основном, приводит к экстракции липидов рогового слоя, способствуя усилению проницаемости для феназепам.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. O. Potts and G. W. Clery, *J. Drug Target*, **4**(3), 247 – 251 (1995).
2. И. А. Кравченко, С. А. Андронати, В. Б. Ларионов, *Физико-химические основы усиления трансдермального введения лекарственных препаратов*, Одесса, Астропринт (2002).
3. K. Levang Angela, Zhao Kaidi, and Singh Jagdish, *Int. J. Pharmaceut.*, **181**, 255 – 263 (1999).
4. H. K. Vaddi, P. C. Ho, Y. W. Chan, et al., *J. Contr. Rel.*, **81**, 121 – 133 (2002).
5. M. Gniadecka, O. Neilsen, H. D. Christensen, et al., *J. Invest. Dermatol.*, **110**(4), 393 – 398 (1998).
6. R. N. A. H. Lewis, R. N. Mc Eelhaney, *Fourier transform infrared spectroscopy in the study hydrated lipids and lipid bilayer membranes*, in: H. H. Mantsch, D. Chapman (Eds.), *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss, New York (1996), pp. 159 – 202.
7. G. M. Golden, J. E. McKic, R. O. Potts, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 25 – 28 (1987).
8. B. Berner, P. Liu, *Alcohols*, In: *Percutaneous Penetration Enhancers*, Smith E. W., Maibach H. I. (Eds.), CRC Press (1999), Chap. 3.1.
9. H. Torii, M. Tasumi, *Theoretical analysis of the amide I infrared bands of global proteins*, in: H. H. Mantsch, D. Chapman (Eds.), *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Eiss, New York (1996), pp. 1 – 18.
10. Y. Takeuchi, H. Yasukama, Y. Yamaoka, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1887 – 1901 (1992).

Поступила 25.05.03