

Ю. А. Бойко<sup>1</sup>, И. А. Кравченко<sup>1,2</sup>, Н. С. Новикова<sup>2</sup>, А. В. Егорова<sup>1,2</sup>,  
Д. И. Александрова<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ СИСТЕМ ЭФИРОВ ХОЛЕСТЕРИНА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ КОЖИ

<sup>1</sup> Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Одесса, Украина;

<sup>2</sup> Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса, Украина

Исследованы механизмы влияния жидкокристаллических систем эфиров холестерина на проницаемость кожи. Изучено влияние жидкокристаллических систем эфиров холестерина на чрезкожное проникновение феназепама из трансдермальных терапевтических систем в условиях *in vivo*. Исследование изменения текучести фосфолипидных липосом и липосом, полученных из липидов рогового слоя, проведено при использовании флуоресцентной спектроскопии. Показано, что жидкокристаллические системы холестерина являются эффективными усилителями проницаемости кожи.

**Ключевые слова:** эфиры холестерина, жидкокристаллический, трансдермальный.

Изучение путей введения лекарственных веществ (ЛВ) — одно из приоритетных направлений современной фармакологии. Одним из сравнительно новых и перспективных путей введения является трансдермальный [1, 2]. Особого интереса заслуживают химические соединения, способные изменять свойства кожного барьера, увеличивая его проницаемость для ЛВ. В качестве усилителей могут выступать многие классы химических веществ — насыщенные и ненасыщенные карбоновые кислоты [3, 4], терпены [5 – 7], спирты [8, 9] и др.

Кроме вышеназванных соединений, в качестве потенциальных усилителей чрезкожной проницаемости могут выступать холестерин и его эфиры. Являясь естественными компонентами всех клеточных мембран [10], в том числе и клеток эпидермиса [11], холестерин и его эфиры оказывают воздействие не только на физиологические процессы, протекающие в коже [12 – 14], но и непосредственно влияют на жидкокристаллическую структуру липидных мембран и межклеточного матрикса [12, 15]. Способность холестерина и его эфиров образовывать разнообразные жидкокристаллические системы (ЖС) дает возможность получить жидкие кристаллы с заданной температурой фазового перехода. В свою очередь это открывает широкие перспективы по созданию систем, близких по своим особенностям к жидкокристаллическим эпидермальным структурам и способным эффективно влиять на них непосредственно при температуре человеческого тела.

Нами исследовано влияние ЖС эфиров холестерина на проницаемость кожи для феназепама, а также их влияние на структуру рогового слоя и текучесть липосом.

### Экспериментальная часть

В качестве активного соединения в опытах *in vivo* использовали 7-бром-5-(2'-хлор)фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он (феназепам) и 7-бром-3-гидрокси-5-(2'-хлор)фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бен-

здиазепин-2-он (3-гидроксифеназепам), синтезированный в Физико-химическом НИИ НАН Украины.

Состав ЖС эфиров холестерина и жирных кислот приведен в таблице. Все эфиры холестерина получены от Sigma-Aldrich.

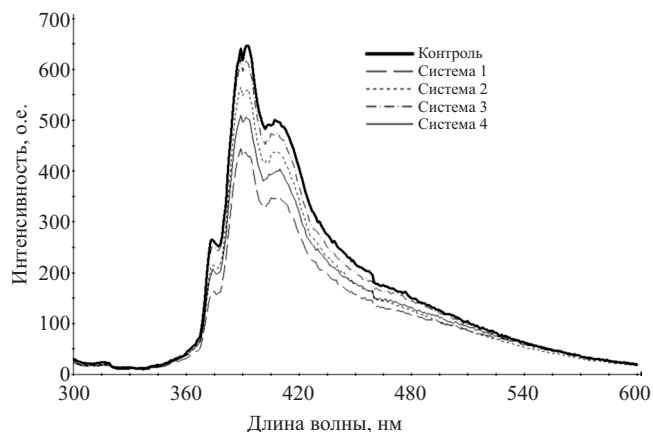
Для исследования проницаемости кожи *in vivo* использовались белые беспородные мыши-самцы массой 18 – 22 г, а также молодые крысы-самцы линии Вистар массой 180 – 200 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к корму и воде.

В случае исследования кожной проницаемости на мышцах трансдермальные терапевтические системы (ТТС) изготавливали по следующей методике: 50 мг ЖС эфиров холестерина расплавляли, к полученному расплаву добавляли феназепам и тщательно перемешивали. Полученную ТТС заливали в форму и оставляли застывать до твердого состояния. Концентрация производного 1,4-бенздиазепина в готовой системе составляла 0,1 мг/см<sup>2</sup>. При исследовании кожной проницаемости на крысах использовали ТТС массой 1,25 г и площадью 25 см<sup>2</sup>. Концентрация феназепама и 3-гидроксифеназепама составляла 0,4 мг/см<sup>2</sup>. Данные ТТС относятся к матричному типу.

В качестве сравнения использовали ТТС следующего состава: вода, поливиниловый спирт (х.ч.), глицерин (х.ч.), полиэтиленоксид-400 (х.ч.) и 1,2-пропиленгликоль (х.ч.) в соотношении 4:2:1:1:2. Концентрация феназепама в готовой системе составляла 0,1 мг/см<sup>2</sup>.

Аплицирование ТТС проводилось на предварительно выстриженную межлопаточную область. Для мышей время аппликации составляла 2 ч, размер апплицированной ТТС — 1 см<sup>2</sup>, для крыс время аппликации — 6 ч, размер апплицированной ТТС — 25 см<sup>2</sup>.

При исследовании на мышцах оценка количества проникшего вещества осуществлялась по фармакологическому ответу организма путем определения минимальных эффективных доз коразола (МЭД), вызывавших клонико-тонические судороги (КТС) и тоническую



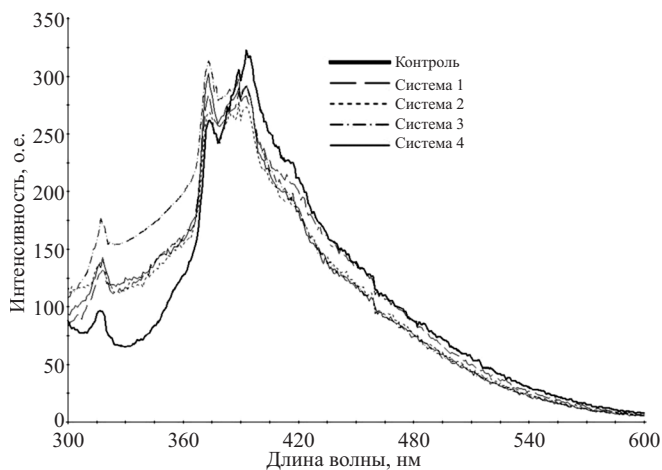
**Рис. 1.** Спектры флуоресценции пирена в фосфолипидной мембране при добавлении различных ЖС эфиров холестерина при  $t = 37^\circ\text{C}$

экстензию (ТЭ) при его введении в хвостовую вену экспериментальным животным. Противосудорожная активность препарата выражалась в показателях ДКТС (средняя минимальная эффективная доза коразола, вызывавшая КТС) и ДТЭ (средняя минимальная эффективная доза коразола, вызывавшая ТЭ). В качестве контроля были использованы показатели ДКТС и ДТЭ животных, не получавших противосудорожного препарата. В качестве базовой ТТС использовали ТТС сравнения (состав указан выше). Коразол получен от Sigma-Aldrich.

При исследовании на крысах количество проникшего в организм вещества определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 3D LC System с УФ-детектором с использованием колонки из нержавеющей стали размером  $0,15\text{ м} \times 4,6\text{ мм}$ , заполненной сорбентом типа Zorbex Eclipse XDR- $\text{C}_{18}$  с размером частиц  $5\text{ мкм}$ .

Влияние на физико-химические свойства мембран (текучесть, полярность) определяли с помощью метода мембранных зондов. В качестве мембранного зонда использовали пирен (Merck Chemicals), который включали в состав фосфолипидных липосом и липосом, полученных из липидов рогового слоя кожи. Интенсивность флуоресценции пирена измеряли на флуориметре "Varian Carry Eclipse". Температуры, при которых проводили измерения интенсивности флуоресценции, совпадали с температурами фазового перехода для каждой из исследованных систем. Липосомы готовили следующим образом: пирен, усилитель проницаемости (ЖС), лецитин или липиды рогового слоя кожи в молярном соотношении 1:10:100 растворяли в хлороформе, после чего хлороформ отгонялся. К сухому остатку добавляли воду и интенсивно взбалтывали в течение 10 мин до образования эмульсии. Полученную эмульсию обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин при частоте 22 КГц. Концентрация липосом в исследуемых растворах составляла  $0,8\text{ г/л}$ , размер липосом колебался от 260 до 17500 нм [16].

Липиды рогового слоя кожи получали из предварительно отпрепарированного рогового слоя кожи по



**Рис. 2.** Спектры флуоресценции пирена в мембранах из липидов рогового слоя при добавлении различных ЖС эфиров холестерина при  $t = 37^\circ\text{C}$

классической методике Бляя-Дейра [17]. Роговой слой заливали системой хлороформ — метанол — вода (1:2:0,8). После этого экстракт разбавляли одним объемом воды и хлороформа. Из образовавшейся двухфазной системы отделяли нижний хлороформный слой, упаривали в роторном испарителе, остаток растворяли в безводном четыреххлористом углероде. Состав полученной липидной смеси — церамиды (50 %), холестерин (25 %), жирные кислоты (10 %), нейтральные жиры (15 %).

Статистическую обработку проводили в программном пакете Microsoft Office Excel 2003, достоверность отличий в полученных данных оценивали по критерию Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Для определения изменения свойств биологических мембран широкое применение нашел метод мембранных флуоресцентных зондов. В качестве мембранного зонда нами был выбран пирен, использовать последний можно как в свободном, так и в связанном состоянии [18 – 20]. Подобный выбор обусловлен тем, что по изменению отношений максимумов интенсивности флуоресценции молекулы пирена можно судить об изменении уровня текучести и полярности липидного бислоя [21]. Пирен не содержит полярных групп и включается в бислой на уровне ацильных остатков, позволяя оценить изменения во внутренней части бислоя. Полученные данные по изменению интенсивности флуоресценции пирена представлены на рис. 1.

Для определения изменений в микровязкости мембран используют соотношения максимумов интенсивности флуоресценции при 470 и 370 нм ( $I_{470}/I_{370}$ ), что соответствует его эксимерной и мономерной формам. Как видно из приведенных спектров, пиков, соответствующих эксимерной форме, не наблюдается. Из чего мы пришли к заключению об отсутствии влияния жидкокристаллических систем сложных эфиров холестерина на микровязкость лецитиновых липосом. Мы

можем предположить, что в отличие от холестерина его сложные эфиры не занимают столь жесткое положение в липидных мембранах и тем самым не ограничивают подвижность ацильных остатков фосфолипидов. В то же время наблюдается снижение коэффициента полярности (соотношение интенсивностей максимумов флуоресценции при 370 и 390 нм ( $I_{370}/I_{390}$ )) с 0,38 до 0,33. Снижение коэффициента полярности наблюдалось в случае добавления всех жидкокристаллических систем в состав исследованных липосом. Наиболее выраженное действие на повышение гидрофобности в интегральной зоне мембран оказала жидкокристаллическая система 1, содержащая более 50 % короткоцепочечных эфиров.

Роговой слой кожи содержит незначительное количество фосфолипидов, поэтому для получения данных относительно влияния ЖС эфиров холестерина на липиды кожи были выделены липиды рогового слоя, из которых в дальнейшем изготовлены липосомы. В состав липидов рогового слоя входили следующие компоненты — церамиды (~ 60 %), холестерин и его сложные эфиры (~ 25 %), жирные кислоты (~ 15 %). Данные по влиянию ЖС эфиров холестерина на интенсивность флуоресценции пирена в липосомах из липидов рогового слоя приведены на рис. 2.

При добавлении в состав липосом, полученных из липидов рогового слоя кожи, ЖС холестерина, коэффициент полярности пирена  $I_{370}/I_{390}$  возрастал с 0,77 до 1,07 в случае использования ЖС 2. Наблюдаемое увеличение полярности может свидетельствовать о повышении включения воды в состав липидного бислоя. При добавлении всех остальных систем также наблюдался рост коэффициента полярности, однако не столь значительный, как в случае ЖС 2. Следует отметить, что приведенные рассуждения подтверждаются нашими более ранними исследованиями [22].

Исследование влияния ЖС эфиров холестерина на уровень проницаемости кожи для феназепама в условиях *in vivo* проведено с помощью определения минимальных эффективных доз (МЭД) коразола, вызывающих КТС и ТЭ у экспериментальных животных. Полученные данные представлены на рис. 3.

Все исследованные ЖС эфиров холестерина оказывали выраженное влияние на изменения МЭД коразола по отношению к контрольным значениям. Наиболь-

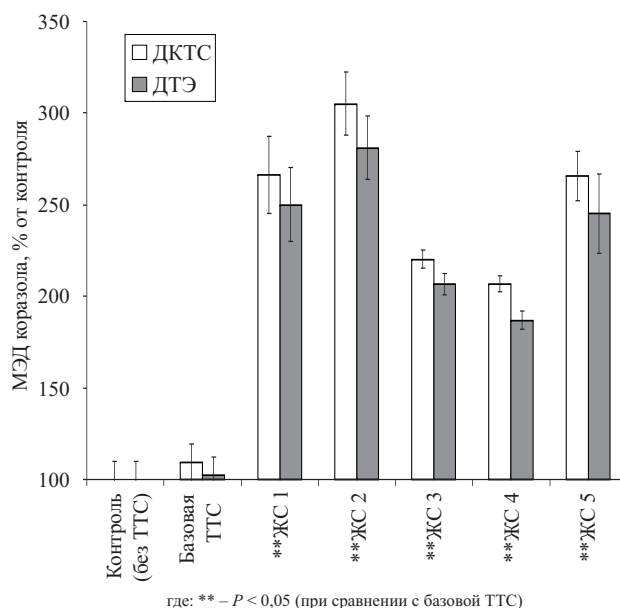


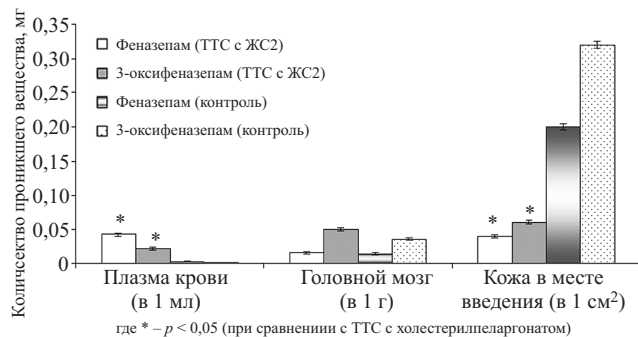
Рис. 3. Противосудорожная активность феназепама при трансдермальном введении (доза 0,1 мг/см<sup>2</sup>)

шее увеличение показателей ДТЭ и ДКТС зафиксировано при использовании в качестве усилителя ЖС 2 (ДКТС — 305 %, ДТЭ — 281 %). Такую высокую активность ЖС 2 можно объяснить температурой фазового перехода, соответствующей температуре участка кожи в месте наложения ТТС. Высокие показатели были зафиксированы также для ЖС 1 (ДКТС — 266 % и ДТЭ — 250 %) и ЖС 5 (ДКТС — 265 %, ДТЭ — 245 %). Температуры фазовых переходов этих систем также близки к температуре поверхности кожи опытных животных, которая составляла  $28 \pm 0,5$  °C (измерения проводились при помощи термодпары). Температуры фазовых переходов (таблица) ЖС 3 и 4 заметно превосходят температуру кожи. В связи с этим увеличение показателей ДКТС и ДТЭ при использовании данных систем лишь незначительно отличалось от показателей контрольной ТТС без усилителей проницаемости. Таким образом, нами в условиях *in vivo* было подтверждено влияние фазовых переходов на изменение проницаемости кожи.

При помощи метода ВЭЖХ нами определены абсолютные количества феназепама и 3-гидроксифеназе-

#### Состав использованных жидкокристаллических систем эфиров холестерина

Система	Состав	Температура фазового перехода, °C
ЖС 1	Холестерилпеларгонат (45 %), $t_{\text{плавления}} = 90,8$ °C, холестерилвалерат (25 %), $t_{\text{плавления}} = 93$ °C, холестерилсукцинат (30 %), $t_{\text{плавления}} = 179$ °C	27,5 – 36,5
ЖС 2	Холестерилпеларгонат (50 %), $t_{\text{плавления}} = 90,8$ °C, холестерилвалерат (25 %), $t_{\text{плавления}} = 93$ °C, холестериладипинат (25 %), $t_{\text{плавления}} = 195$ °C	24,5 – 31,5
ЖС 3	Холестерилпеларгонат (52,9 %), $t_{\text{плавления}} = 90,8$ °C, холестерилвалерат (21,4 %), $t_{\text{плавления}} = 93$ °C	32,5 – 42,5
ЖС 4	Холестерилпеларгонат (85 %), $t_{\text{плавления}} = 90,8$ °C, холестерилпропионат (15 %), $t_{\text{плавления}} = 95,2$ °C	37 – 45



**Рис. 4.** Количество проникшего в организм феназепама и 3-гидроксифеназепама при чрезкожном введении (доза 0,4 мг/см<sup>2</sup>)

пама, проникшего из трансдермальной терапевтической системы, основанной на ЖС 2 (25 см<sup>2</sup>), при чрезкожном пути введения в организм крыс (рис. 4). В качестве контрольной системы сравнения использовали ТТС, где усилителем проницаемости выступал холестерилпеларгонат.

Наибольшее количество феназепама обнаружено в плазме крови — 0,043 мг/мл, а 3-гидроксифеназепама в коже — 0,06 мг/см<sup>2</sup>. Расчеты показали [23], что из ТТС, основанной на ЖС 2, в организм крысы всасывается 60 % феназепама и 69 % 3-гидроксифеназепама, от начального их содержания в ТТС, через участок кожи площадью 25 см<sup>2</sup> за 6 ч аппликации. Подобные значения свидетельствуют о высокой эффективности ЖС 2 в качестве усилителя трансдермальной проницаемости.

Термотропные жидкокристаллические системы эфиров холестерина являются эффективными усилителями проницаемости кожи в случае, когда температура их фазового перехода совпадает с температурой кожи в месте аппликации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта государственного фонда фундаментальных исследований, грант № Ф47/021.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. А. Кравченко, *Трансдермальное введение лекарственных препаратов*, "Астропринт", Одесса (2001), сс. 10 – 20.
2. И. А. Кравченко, А. С. Андронати, В. Б. Ларионов, *Физико-химические основы усиления трансдермального введения лекарственных препаратов*, "Астропринт", Одесса (2002), сс. 15 – 27.
3. M. J. Kim, H. J. Doh, M. K. Choi, et al., *Drug Deliv.*, **15**(6), 373 – 379 (2008).
4. C. Puglia, F. Bonina, *Drug. Deliv.*, **15**(2), 107 – 112 (2008).
5. M. Rizwan, M. Aqil, A. Ahad, et al., *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **34**(6), 618 – 626 (2008).
6. R. Jain, M. Aqil, A. Ahad, et al., *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **34**, 384 – 389 (2008).
7. L. Zhao, L. Fang, Y. Xu, et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **69**(1), 199 – 213 (2008).
8. A. Ahad, M. Aqil, K. Kohli, et al., *Expert. Opin. Theor. Pat.*, **19**(7), 969 – 988 (2009).
9. C. Y. Goates, and K. Knutson, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1195**(1), 169 – 179 (1994).
10. K. Urata, and N. Takaishi, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **103**(1), 29 – 39 (2001).
11. D. C. Swartzendruber, P. W. Wertz, D. J. Kitko, et al., *J. Invest. Dermatol.*, **92**(2), 251 – 257 (1989).
12. Т. А. Белоусова, М. В. Горячкина, *Рус. мед. ж.*, **12**(18), 1082 – 1085 (2004).
13. K. R. Feingold, *J. Lipid Res.*, **48**, 2531 – 2546 (2007).
14. P. M. Elias, M. L. Williams, and W. M. Holleran, *J. Lipid Res.*, **49**, 697 – 714 (2008).
15. J. Cladera, P. O'Shea, J. Hadgraft, et al., *J. Pharm. Sci.*, **92**(5), 1018 – 1027 (2003).
16. Ю. Е. Шапиро, А. В. Смирнова, И. Ф. Макаревич и др., *Биополимеры и клетка*, **13**(3), 213 – 217 (1997).
17. E. G. Blygh, W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**(86), 911 – 917 (1959).
18. S. Shrivastava, Y. D. Paila, A. Dutta, et al., *Biochemistry*, **47**(20), 5668 – 5677 (2008).
19. L. Guyader, C. Roux, S. Mazères, et al., *Biophys J.*, **93**(12), 4462 – 4473 (2007).
20. Y. Barenholz, T. Cohen, E. Haas, et al., *J. Bio. Chem.*, **271**(6), 3085 – 3090 (1996).
21. Г. Е. Савченко, А. П. Ступак, Е. А. Ключаренко, *Ж. приклад. спектроскоп.*, **69**(4), 497 – 501 (2002).
22. S. A. Andronati, I. A. Kravchenko, Yu. A. Boyko, et al., *Ukrainica Bioorganica Act.*, № 1, 17 – 21 (2011).
23. В. Н. Соловьев, А. А. Фирсов, В. А. Филов, *Фармакокинетика (руководство)*, Москва, Медицина (1980), сс. 260 – 293.

Поступила 13.12.11

## INFLUENCE LIQUID CRYSTAL SYSTEMS OF CHOLESTEROL ESTERS ON SKIN PENETRATION

Yu. A. Boyko<sup>1</sup>, I. A. Kravchenko<sup>1,2</sup>, N. S. Novikova<sup>1</sup>, A. V. Egorova<sup>1,2</sup>, D. I. Alexandrova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Odessa National University, Department of Pharmaceutical Chemistry, 65026, Ukraine, Odessa, 2, Dvoryanskaya str.

<sup>2</sup> AV Bogatsky Physics-Chemical Institute of NAS of Ukraine, 65126, Ukraine, Odessa, 86, Lyustdorfskaya str.

The influence of liquid crystal system of cholesterol esters on non polar compound permeation in skin was investigated to further understand esters-enhanced permeation mechanism. Investigation studied the effect of liquid crystal system of cholesterol esters on the *in vivo* permeation of phenazepam from transdermal delivery system across skin. Molecular-level mechanisms of fluidity of large unilamellar phospholipids and lipid of stratum corneum vesicles were investigated using fluorescence spectroscopy. Our findings demonstrate that liquid crystal systems of cholesterol esters can be effective enhancer transdermal delivery.

**Keywords:** cholesterol esters; liquid-crystal; transdermal.