

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2006

Г. К. Исмаилова¹, В. И. Ефременко², И. В. Савельева², О. В. Логвиненко²

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ НОВОЙ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПРЕДНИЗОЛОНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ

¹ Пятигорская государственная фармацевтическая академия;

² Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

В настоящее время перспективным является использование сочетания направленного транспорта магнитоуправляемых липосомальных форм лекарственных веществ к органу-мишени с локальным воздействием внешнего магнитного поля. Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение противовоспалительного действия при экспериментальном аллергическом дерматите магнитоуправляемых липосом с преднизолоном, липосомального преднизолон, магнитоуправляемых липосом, 0,5 % преднизолоновой мази. Магнитоуправляемые липосомы с преднизолоном получали методом “выпаривания и обращения фаз”, используя смесь фосфолипидов и холестерина, полученных из головного мозга крупного рогатого скота. В качестве магнитного носителя использовали мелкодисперсный магнетит. Проведенные экспериментальные исследования позволили установить более выраженное противовоспалительное действие магнитоуправляемых липосом с преднизолоном по сравнению со свободным препаратом.

Для лечения больных дерматитами широко используются мази на основе кортикостероидов, оказывающие выраженное противовоспалительное действие. В настоящее время существует большое количество кортикостероидных препаратов для местного применения — от гидрокортизона, преднизолон, до их синтетических производных. Благодаря своим преимуществам преднизолон представляет большой интерес для клиницистов. Преднизолон по сравнению с гидрокортизоном действует в 5 раз активнее, в меньшей степени задерживает в организме ионы натрия и хлора, а продолжительность периода полураспада его в тканях больше в 2 раза. Однако при применении уже имеющихся лекарственных форм преднизолон наряду с быстрым регрессом высыпаний вскоре наступают рецидивы дерматозов. Кроме того, повторное использование указанных мазей приводит к ослаблению противовоспалительного действия, а применение других наружных средств ведет к усилению воспалительных явлений [1]. Поэтому создание новых, более эффективных лекарственных форм кортикостероидных препаратов, обладающих выраженным противовоспалительным действием, является весьма актуальной задачей фармации.

В последнее время внимание исследователей привлекли липосомы в качестве удобного биологического нейтрального контейнера для транспорта лекарственных препаратов. Липосомы позволяют создавать в организме большого своеобразное депо лекарственного вещества; они нетоксичны, биodeградируемы, их использование приводит к уменьшению дозировки и побочного действия лекарственных средств, снижению

аллергических и иммунных реакций, в их состав можно включать как водо-, так и жирорастворимые соединения, а небольшой размер частиц (около 100 нм) позволяет более интенсивно проникать в клетку препарата и на определенный период задерживаться в ней [2, 3]. К тому же, опубликованы интересные данные о способности липосом значительно снижать явления отека и альтерации мягких тканей при воспалительных процессах и подавлять рост условно-патогенной микрофлоры, что позволяет рассматривать липосомы как перспективное самостоятельное противовоспалительное средство [4].

В настоящее время актуальным направлением является использование направленного транспорта липосомальных форм лекарственных веществ к органу-мишени с помощью внешних физических воздействий. Перспективен способ сочетания липосомального введения магнитоуправляемого лекарственного средства с локальным воздействием внешнего магнитного поля. Магнитоуправляемые липосомы представляют собой липидные везикулы, в которые одновременно с лекарственным веществом инкапсулированы мелкодисперсные частицы магнитных материалов. Такие липосомы, циркулирующие в кровотоке, можно фиксировать в определенном органе или тканях макроорганизма, сфокусировав в этом месте за счет внешних источников магнитное поле, удерживающее магнитные липосомы. По мере их биodeградации лекарственные препараты высвобождаются из липидных оболочек, что обеспечивает их высокую концентрацию в заданном участке тела животного или человека [2, 5, 6].



Рис. 1. Кожа морской свинки до лечения, окраска гематоксилин-эозином. Ув. × 250.



Рис. 2. Кожа морской свинки, леченная магнитоуправляемыми липосомами с преднизолоном, окраска гематоксилин-эозином. Ув. × 250.

Магнитные свойства лекарственных средств определяются, главным образом, характером магнитного наполнителя. В качестве такового часто используется коллоидный магнетит (Fe_3O_4). Исследования последних лет позволили доказать, что магнетит может образовываться в самом организме, т.е. иметь эндогенное происхождение. Биогенный магнетит обнаружен у самых разных представителей животного мира, включая человека [7]. Исследование токсичности водного коллоидного магнетита на белых крысах показало, что магнетит является веществом с очень низкими токсическими свойствами [8]. В [9] было убедительно доказано, что магнетитовая магнитная жидкость является веществом с низким уровнем мутагенной опасности. Также достоверно установлено, что мелкодисперсный магнетит исчезает из кровяного русла через 1 – 6 ч после внутривенного или внутриартериального введения и перераспределяется по другим органам и тканям. Выведение магнетита из организма осуществляется почками [10, 11]. Авторы [12] считают, что магнитные частицы переносятся кровотоком в печень и выводятся вместе с желчью в желудочно-кишечный тракт. Авторы [13] показали, что частицы магнитных материалов к концу второй недели после введения выводятся из организма вместе с мочой и калом. Все это свидетельствует о том, что мелкодисперсный магнетит можно рассматривать как магнитный наполнитель лекарственных средств.

Биотропные свойства магнитных полей, связанные с их многофакторным фармакологическим действием, общепризнаны и широко используются в стоматологии, кардиологии, хирургии, травматологии и других областях медицины. В работах [6, 14] отмечается, что под воздействием магнитного поля улучшаются микроциркуляция и трофика тканей, стимулируются регенеративные и репаративные процессы, повышается неспецифическая резистентность организма.

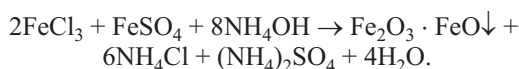
Экспериментально установлено положительное влияние постоянного электромагнитного поля на аллергические реакции кожи. Это открывает перспекти-

ву использования магнитного поля при нейроаллергических дерматозах. В [15] получены данные о терапевтическом эффекте постоянного магнитного поля при хронической экземе и нейродермите.

Экспериментальная часть

Липосомы получали методом “выпаривания и обращения фаз”, используя смесь фосфолипидов и холестерина, выделенных из головного мозга крупного рогатого скота. Фракционный состав полученного комплекса фосфолипидов из головного мозга крупного рогатого скота определяли методом ТСХ на пластинках “Silufol” размером 15 × 15 см в системе растворителей хлороформ – метанол – вода (65:25:4). В качестве свидетелей использовали тест-наборы стандартов фосфолипидов (“Sigma”, USA). Обнаружено, что помимо фосфатидилхолина, фосфатидилглицерина, фосфатидилинозитола, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидных кислот, в нем содержится дополнительно кардиолипин, сфингомиелин, цереброзиды, холестерин и нейтральные липиды. Электронно-микроскопический контроль образования и размеров липосом осуществляли при исследовании нативных препаратов липосом. Электронно-микроскопический контроль при инструментальном увеличении 50000 – 80000 показал в полученном препарате наличие липосом размером 100 – 850 нм.

В качестве магнитного носителя использовали мелкодисперсный магнетит, полученный путем осаждения из 0,005 М раствора железа сульфата(II) и 0,009 М раствора железа хлорида(III), в перчете на ион железа, 1,6 % раствором гидроксида аммония:



Для получения липосомального преднизолон использовали субстанцию преднизолон № 71/609/42 производства ГНИИ стандартизации и контроля лекарственных средств МЗ РФ (Россия) в порошке.



Рис. 3. Кожа морской свинки, леченная липосомальным преднизолоном, окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 250$.

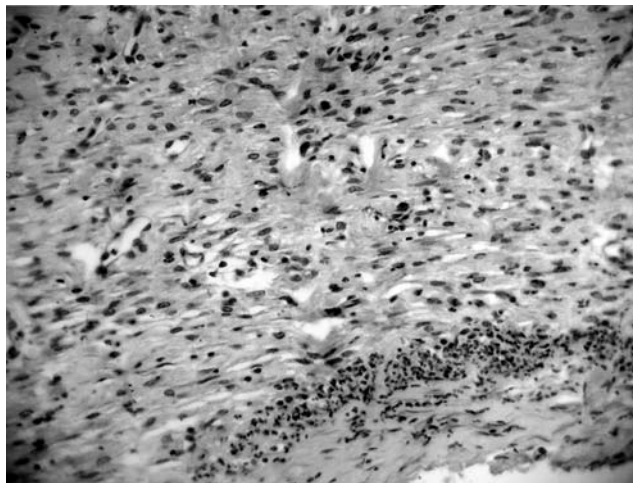


Рис. 4. Кожа морской свинки, леченная магнитоуправляемыми липосомами, окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 250$.

Для отделения сформировавшихся липосом от не включившегося материала полученную суспензию липосом пропускали через гель-хроматографическую колонку (Сефадекс G-50).

Степень включения магнитного носителя и преднизолона во внутренний объем липосом составила 68,5 и 73,4 % соответственно.

Количество магнетита, инкапсулированного в магнитоуправляемые липосомы, при определении гравиметрическим методом составило 0,14 %. Для определения количества фиксированного в липосомы преднизолона использовали спектрофотометрический метод. Среднее содержание иммобилизуемого препарата во внутренний объем липосом составило 0,46 %, что сопоставимо с дозой действующего вещества в 0,5 % преднизолоновой мази.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение противовоспалительного действия магнитоуправляемых липосом с преднизолоном, липосомального преднизолона, магнитоуправляемых липосом, 0,5 % преднизолоновой мази при экспериментальном аллергическом дерматите.

Исследования проводились на 40 морских свинках-самцах светлой масти массой 350 – 400 г. Контактный аллергический дерматит вызывали нанесением в течение 3 дней на эпилированный правый бок животного 5 капель 5 % раствора 2,4-динитрохлорбензола в смеси спирта с ацетоном (2:1). Животные были разделены на 5 групп. 1-ой группе экспериментальных животных на участок поражения наносили тонким слоем магнитоуправляемые липосомы с преднизолоном, 2-ой группе — липосомальный преднизолон, 3-ей группе — магнитоуправляемые липосомы, 4-ой — 0,5 % преднизолоновую мазь, 5-ая группа лечению не подвергалась, очаг поражения обрабатывали физиологическим раствором (контрольная группа).

1-ой и 3-ей группам животных дополнительно обрабатывали участки поражения магнитным полем неконтактно, с зазором 0,5 см от рабочей поверхности

устройства “ЭДМА” до поверхности кожи в течение 10 мин по 3-ему режиму работы аппарата (50 Гц).

Клинические результаты лечения животных (на пике развития дерматита, в середине срока лечения и при исчезновении дерматита) оценивали по характеристике аллергического процесса (интенсивность воспалительной реакции).

Особое внимание заслуживало изучение гистологического состояния кожи в процессе лечения, которое давало определенное представление об эффективности терапии.

Для гистологического исследования тканей при лечении исследуемыми образцами в соответствующие сроки производили биопсию в очаге поражения. Материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина с последующим проведением в спиртах возрастающих концентраций, заключали в парафин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

На 4-ый день опыта, т.е. на пике развития дерматита на коже животных возникали очаги поражения размером около 2,4 – 2,9 см с выраженной гиперемией, эритемой, микровезикуляцией и резко выраженным очагом мокнутия с последующим образованием инфильтратов, серозных корок и множественных эрозий.

При лечении магнитоуправляемыми липосомами с преднизолоном с приложением внешнего магнитного поля признаки дерматита у животных 1-ой группы исчезали на 8-й день, у животных 2-ой и 3-ей групп при использовании липосомального преднизолона и 0,5 % преднизолоновой мази соответственно — в среднем на 10-й день. При лечении 4-ой группы животных магнитоуправляемыми липосомами с экспозицией магнитного поля выздоровление наблюдалось на 13-й день, у контрольной группы животных — на 18-й день. Полученные данные свидетельствуют, что наиболее эффективными при воспалительном процессе оказались магнитоуправляемые липосомы преднизолона, липосомальный преднизолон и 0,5 % преднизолоновая мазь.

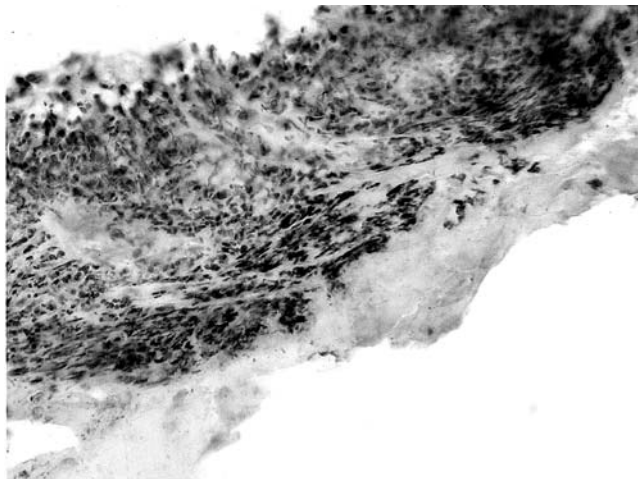


Рис. 5. Кожа морской свинки, леченная 0,5 % преднизолоновой мазью, окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 250$.

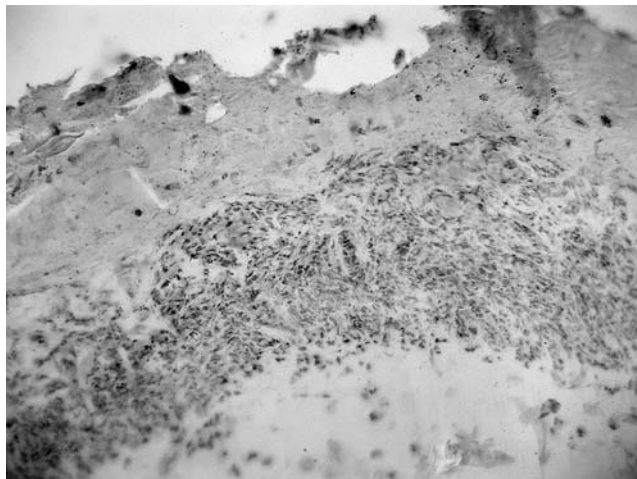


Рис. 6. Кожа морской свинки (контроль), окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 250$.

При гистологическом исследовании кожи морских свинок через 24 ч после нанесения 5 % раствора 2,4-динитрохлорбензола макроскопически определялся умеренный отек, гиперемия кожного покрова, очаговый некроз. Микроскопически в дерме отмечалось умеренное поражение сосудов с периваскулярным инфильтратом, в которых кроме мононуклеаров, обнаруживали нейтрофильные гранулоциты и тканевые базофилы с явлениями дегрануляции. После повторного нанесения алергизирующей дозы динитрохлорбензола в течение 3 суток микроскопические изменения имели следующий характер. В базальном слое эпидермиса наблюдалась патологическая подвижность полых стволовых клеток. В шиповатом слое было много зернистых включений, потеряны межклеточные мостики. Оптически обнаруживались включения, представленные гигантскими митохондриями. В зернистом слое выявлялось активное формирование рогового вещества для нового слоя, определялось большое количество полых клеток. Наблюдалась ответная реакция всех слоев эпидермиса (рис. 1).

Макро- и микроскопическое изучение биоптатов кожи морских свинок производили на 18 сутки от начала лечения.

После лечения магнитоуправляемыми липосомами с преднизолоном в эпидермисе кожи животных 1-ой группы имелись лишь отдельные участки чрезмерного утолщения рогового слоя эпидермиса — гиперкератоза. В основе гиперкератоза мог лежать интенсивный синтез кератина при повышенной функциональной активности клеток эпидермиса или же повышенное содержание в роговом слое мукополисахаридов, играющих цементирующую роль и мешающих разъединению клеток рогового слоя при шелушении. Отмечалась небольшая гиперплазия зернистого слоя. В остальных слоях выраженных изменений не обнаруживалось (рис. 2).

После лечения липосомальным преднизолоном 2-ой группы животных в эпидермисе микроскопически наблюдалось большое количество макрофагов,

плазмоцитов, что говорит о формировании молодой грануляционной ткани, происходило усиленное формирование примитивных сосудов (рис. 3).

После лечения магнитоуправляемыми липосомами в биоптате 3-ей экспериментальной группы морских свинок макроскопически была видна гиперемия кожного покрова, умеренный отек, десквамация эпидермиса. Микроскопически в эпидермисе отмечались гиперкератоз, функциональная активность клеток базального слоя, гиперхромия (рис. 4).

После лечения 0,5 % преднизолоновой мазью в эпидермисе кожи морских свинок 4-ой группы патологический процесс, несмотря на полный регресс дерматита, был резко выражен. Наблюдалось очень быстрое формирование созревающей грануляционной ткани с участками уже зрелой ткани, образование коллоидного рубца (рис. 5).

У контрольной группы на 18-е сутки наблюдалось в дерме большое скопление микробов, более выраженный коагуляционный некроз эпидермиса, очевидно, что после заживления сформируется грубый рубец (рис. 6). Наличие микроорганизмов в дерме свидетельствует о присоединении инфекционного процесса к воспалительному. При лечении животных 1 – 4 групп вышеуказанными препаратами инфекционный процесс отсутствовал, что подтверждает литературные данные о способности подавлять рост условно-патогенной микрофлоры липосомами, магнетитом и магнитным полем [4, 14, 16, 17].

Следует подчеркнуть, что во всех экспериментах после проведенного лечения выраженного поражения дермы выявлено не было, отмечалось лишь полнокровие сосудов.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования позволили установить выраженное противовоспалительное действие магнитоуправляемых липосом с преднизолоном. Полученные данные свидетельствуют о более высокой противовоспалительной активности магниточувствительной липосомальной

формы преднизолонa по сравнению со свободным препаратом.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. М. Перцев, Л. В. Деримедведь, Е. Л. Халеева и др., *Провизор*, № 7, (2002).
2. И. Варпаховская, *Ремедиум*, № 5, 68 – 70 (1999).
3. В. И. Ефременко, *Липосомы (получение, свойства, аспекты применения в биологии и медицине)*, Ставрополь (1999).
4. В. М. Крейнс, В. М. Мельникова, Я. М. Марголин и др., *Вестн. АМН СССР*, № 6, 44 – 47 (1990).
5. Н. А. Брусенцов, Ф. С. Байбуртский, В. В. Тарасов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **36**(4), 32 – 40 (2002).
6. Ю. Я. Харитонов, О. Г. Черкасова, *Фармация*, **45**(5), 14 – 18 (1996).
7. Дж. Киршвинк, Д. Джонс, Б. Мак-Фадден (ред.), *Биогенный магнетит и магниторецепция*, Т. 1, Мир, Москва (1989).
8. Т. Kato, R. Nemoto and H. Mori, *Nippon Gan Chiro Sci*, **15**(5), 876 – 880 (1990).
9. Э. А. Гвазава, В. П. Берия, Д. Ж. Хубутия и др., *Тез. докл. 2 конф.*, Сухуми (1985), сс. 7 – 8.
10. Л. Г. Санелидзе, Н. Г. Джобава, *Тез. докл. 3 конф.*, Сухуми (1989), сс. 115 – 116.
11. Г. Г. Татишвили, М. Г. Ахалая, З. А. Зурабашвили, *Вест. хирургии*, № 4, 37 – 39 (1989).
12. Е. Г. Тырси́на, Ш. И. Крисько, А. А. Кузьмичев и др., *Тез. докл. 2 конф.*, Сухуми (1985) сс. 59 – 60.
13. А. М. Демещкий, А. И. Попова, Г. Я. Хулуп, *Тез. докл. 2 конф.*, Сухуми (1985), сс. 743.
14. О. Г. Черкасова, *Хим.-фарм. журн.*, **25**(5), 4 – 12 (1991).
15. С. И. Довжанский, В. В. Оржешковский, *Физиотерапия кожных заболеваний*, Изд-во Саратов. ун-та, Саратов (1986).
16. Н. Г. Долидзе, Е. И. Шатиришвили, Э. Г. Амчеславский, *Georgical Med. News*, № 7 – 8, 39 – 41 (2000).
17. О. Г. Черкасова, *Хим.-фарм. журн.*, **26**(7/8), 84 – 88 (1992).

Поступила 08.06.04.

EFFICACY OF A NEW MAGNET-DRIVEN LIPOSOMAL FORM OF PREDNISOLONE IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL ALLERGIC DERMATITIS

G. K. Ismailova¹, V. I. Efremenko², I. V. Savel'eva², and A. G. Kuregyan¹

¹ Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy, Pyatigorsk, Russia;

² State Antiplague Research Institute, Stavropol, Russia

Combination of the directed transport of magnet-driven liposomal forms of drugs to a target organ and the local action of the applied magnetic field is a promising direction for the development of new corticosteroid preparations possessing pronounced antiinflammatory activity. The antiinflammatory properties of magnet-driven liposomes containing prednisolone, liposomal prednisolone, magnet-driven liposomes, and 0.5 % prednisolone ointment were evaluated in a comparative test on allergic dermatitis. The magnet-directed liposomes with prednisolone were prepared by means of the evaporation – phase inversion method, using a mixture of phospholipids and cholesterol obtained from cattle brain. Finely dispersed magnetite was used as a magnetic carrier. The experiments showed that the magnet-driven liposomes with prednisolone produce a more pronounced antiinflammatory action than the pure ointment.