

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОЧАСТИЦ ПОЛИМЕР-ЛЕКАРСТВЕННОГО КОМПЛЕКСА С МЕСАЛАЗИНОМ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛИТА У КРЫС

Семина И.И., Кабанова Т.В., Порфирьева Н.Н., Сафина З.З., Ситенков А.Ю.,
Елизарова А.С., Мустафин Р.И.

ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ Минздрава России», Казань, e-mail: semina@mail.ru

Проведена оценка противовоспалительной активности микрочастиц полимер-лекарственного комплекса (ПЛК) с месалазином состава EUDRAGIT® RL 30 D (RL)/месалазин (MS) на модели экспериментального колита у крыс как системы направленной доставки 5-АСК в зону воспалительной реакции. Колит у крыс вызывали введением через прямую кишку 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS). Через один час после введения TNBS и затем через каждые 12 часов в течение 5 дней крысам перорально в 1 % крахмальной слизи вводили: микрочастицы без ЛВ (15 мг/кг); MS (25 мг/кг); микрочастицы ПЛК (40 мг/кг); контрольной группе вводили 1 % крахмальную слизь. Результаты экспериментов показали, что лечение крыс ПЛК с месалазином уменьшает активность маркеров воспалительной реакции – миелопероксидазы (МПО) и малонового диальдегида (МДА) в гомогенате толстого кишечника крыс и уменьшает симптомы воспалительной реакции (наличие крови в фекалиях), в отличие от субстанции MS. Проведенные исследования свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки ПЛК в качестве инновационной лекарственной формы для направленной доставки месалазина.

Ключевые слова: полимер-лекарственный комплекс, месалазин, модель экспериментального колита, миелопероксидаза, малоновый диальдегид.

A STUDY OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF POLYMER-DRUG COMPLEX MICROPARTICLES WITH MESALAZINE ON MODEL OF EXPERIMENTAL COLITIS IN RATS

Semina I.I., Kabanova T.V., Porfirieva N.N., Safina Z.Z., Sitenkov A.Y., Elizarova A.S.,
Moustafine R.I.

Kazan State Medical University, Kazan, e-mail: semina@mail.ru

Evaluation of anti-inflammatory activity of microparticles of polymer-drug complex (PLC) with mesalazine composition EUDRAGIT® RL 30 D (RL) / mesalazine (ICJ) on the model of experimental colitis in rats as a system of targeted delivery of 5-ASA in the inflammatory reaction zone. Colitis was induced by introducing the rat rectum 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). One hour after TNBS administration, and then every 12 hours for 5 days, rats in 1% starch mucus injected: microparticles without LOS (15 mg / kg); MS (25mg / kg); Microparticles PLC (40 mg / kg); the control group was administered 1% starch mucilage. Experimental results have shown that treatment of rats with PLC mesalazine reduces the inflammatory response markers - myeloperoxidase (MPO) and malondialdehyde (MDA) in the homogenate of rat colon and reduces the symptoms of an inflammatory reaction (presence of blood in the faeces), unlike MS substance. Studies indicate the prospects of further development of the PLC as an innovative dosage form for the targeted delivery of mesalazine.

Keywords: polymer-drug complex, mesalazine, a model of experimental colitis, myeloperoxidase, malondialdehyde.

Месалазин, или 5-аминосалициловая кислота (5-АСК), является препаратом первой линии – золотым стандартом терапии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), таких как язвенный колит и болезнь Крона, которые в настоящее время были и остаются одной из наиболее серьезных проблем современной гастроэнтерологии.

Известно, что при приеме внутрь чистый месалазин быстро и практически полностью метаболизируется в тонком кишечнике до неактивного метаболита, который всасывается в

кровь и выводится почками, то есть действующее вещество не доходит до места, где локализуется воспалительный процесс [4]. В настоящее время разработаны и продолжают разрабатываться различные способы доставки 5-АСК до места воспаления – так, в практической медицине применяются лекарственные формы месалазина с молекулой-переносчиком сульфапиридином – препарат сульфасалазин [8,9]. Недостатки этой лекарственной формы заключаются в том, что помимо серьезных побочных эффектов, которые могут возникнуть на любом этапе лечения сульфасалазином, ряд исследований показал более низкую эффективность терапии ВЗК по сравнению с препаратами «чистого» месалазина. Таблетки с замедленным высвобождением месалазина защищают месалазин с помощью оболочки из этилцеллюлозы, которая обеспечивает равномерную концентрацию 5-АСК как в тонкой, так и в толстой кишке, но если воспаление локализовано только в толстой кишке, 30–50 % действующего вещества инактивируется, не проявляя при этом лечебного действия [12]. Лекарственные формы с рН-зависимым высвобождением 5-АСК обеспечивают высвобождение 100 % месалазина при достижении определенных значений рН. Однако в ряде случаев при закислении внутрикишечной среды (при воспалительных процессах) может не происходить растворение оболочки [6]. Разработки оптимальной лекарственной формы месалазина ведутся и в других направлениях [13]. В последние годы разработаны новые лекарственные формы, которые сочетают преимущества двух систем: и рН-зависимое и равномерное высвобождение «по времени» – препараты месалазин ММХ и Салофальк® гранулы [11,14]. Несмотря на интенсивность в области разработки лекарственных форм месалазина, они не лишены недостатков [6], кроме того, многообразие видов ВЗК требует терапии препаратами месалазина с различными фармакокинетическими параметрами. Важным является и то, что на российском фармацевтическом рынке существует только один препарат месалазина – сульфасалазин, который значительно уступает по эффективности ММХ и Салофальк® и обладает достаточно большим числом побочных эффектов, обусловленных самим переносчиком – сульфапиридином.

Ранее нами были разработаны и описаны пероральные системы направленной доставки в ЖКТ диклофенака натрия, индометацина, теофиллина [1,2] и выявлены закономерности конструирования таких систем. На основе этих закономерностей, а также с учетом достоинств и недостатков имеющихся лекарственных препаратов месалазина с доставкой в области воспалительного процесса нами был разработан новый подход к созданию лекарственной формы месалазина – на основе интерполимерных взаимодействий между лекарственным веществом и носителем – и получен полимер-лекарственный комплекс (ПЛК) с месалазином.

Целью настоящего исследования явилась оценка противовоспалительной активности микрочастиц ПЛК с месалазином на модели экспериментального колита у крыс как системы направленной доставки 5-АСК в зону воспалительной реакции.

Материалы и методы исследования

Исследуемый объект представляют собой полимер-лекарственный комплекс (ПЛК) в виде микрочастиц состава EUDRAGIT® RL 30 D/месалазин в соотношении 1:2 (RL:MS, моль/моль). ПЛК был получен с использованием полимера марки Eudragit® RL30D (RL) с ММ 150 КДа (Evonik Röhm GmbH, Германия) и модельного лекарственного вещества месалазина (MS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия). Эксперименты с исследованием кинетики высвобождения MS из сред, имитирующих физиологические среды желудочно-кишечного тракта, показали, что высвобождение MS начинается с pH= 5,8 и продолжается до значений pH =7,0.

С целью доказательства безопасности применения микрочастиц EUDRAGIT® RL 30 D, используемых для доставки MS лабораторным крысам, нами была проведена оценка его «острой токсичности» и характера общего действия. Микрочастицы EUDRAGIT® RL 30 D вводили в дозах 1000, 2000 и 3000 мг/кг в желудок в крахмальной слизи с использованием специального зонда. Каждая доза вводилась 6 крысам. Проводили анализ картины общего действия (наличие угнетающего или возбуждающего действия со стороны центральной нервной системы, отличительные особенности в поведении в сравнении с животными контрольной группы). Кроме того, картину общего действия комплексов на крыс при введении в течение 7 дней определяли по адекватности ориентировочно-исследовательской реакции и двигательной активности. Для изучения ориентировочно-исследовательской реакции и двигательной активности использовали «открытое поле», которое представляет камеру круглой формы с диаметром 50 см с отверстиями. В «открытом поле» в течение 3 мин регистрировали: а) количество пересечений линий и вертикальных стоек, что отражает неспецифический уровень возбуждения; б) количество заглядываний в отверстия как показатель исследовательской активности животного.

Противовоспалительную активность микрочастиц ПЛК с MS в сравнении с субстанцией MS и микрочастицами без MS исследовали на модели воспаления кишечника у крыс. До начала экспериментов все животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной диете в соответствии с действующими нормами при свободном доступе к воде и пище (Приказ МЗ и СР РФ № 708н), а также правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»). Все исследования были согласованы с комитетом по этической экспертизе.

Нами была использована стандартная экспериментальная модель колита, индуцированного у крыс путем введения через прямую кишку 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия). В экспериментах было использовано 30 крыс, весом 200–220 г, которые были разделены на 5 групп (n=6 в каждой группе). Крысам четырех групп вводили через прямую кишку TNBS в дозе 20 мг на 1 крысу в 5 % растворе этанола. Животных произвольно распределяли в разные экспериментальные группы и рассаживали в индивидуальные клетки. Предварительно крысам производили мягкую анестезию внутрибрюшинным введением 25 мг/кг кетамина (Московский эндокринный завод, Россия). Через один час после введения TNBS и затем через каждые 12 часов в течение 5 дней крысам перорально в 1 % крахмальной слизи вводили: микрочастицы без ЛВ (ПК без MS, 15 мг/кг); MS (25 мг/кг) ПЛК (40 мг/кг); контрольной группе вводили 1 % крахмальную слизь; животным пятой группы (интактные) вводили крахмальную слизь без предварительного введения TNBS. В последний день исследования у крыс определяли наличие диареи и скрытой крови в фекалиях и измеряли массу тела. Маркером воспалительной реакции в гомогенате толстого кишечника явились активность миелопероксидазы (MPO), в качестве вспомогательного маркера использовали конечный продукт перекисного окисления липидов – малоновый диальдегид (МДА), концентрация которого существенно возрастает при воспалительной реакции, а MS обладает выраженной антиоксидантной активностью. Подготовку материала для MPO осуществляли согласно [10] с использованием пероксида водорода и о-дианизидина, являющегося субстратом пероксидаз. Измерения проводили на УФ/Вид-спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США). Определение содержания малонового диальдегида (МДА) проводили согласно методу [3].

Результаты экспериментов были обработаны с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Результаты исследования токсичности микрочастиц, используемых для доставки MS, свидетельствуют об их безопасности при применении экспериментальным животным. Крысы оставались живы, и их поведение не отличалось от такового у контрольной группы. 3000 мг/кг – максимальная доза, которую возможно было ввести экспериментальным животным, поэтому ЛД-50 (основной показатель, характеризующий «острую» токсичность, определить не удалось).

Оценка поведения крыс в открытом поле при пероральном введении микрочастиц в максимальной дозе 3000 мг/кг в течение 7 дней показала, что животные опытной и контрольной групп практически не отличались по показателям двигательной и

исследовательской активности (табл. 1), что может предполагать об их безопасности при применении в составе ПЛК с месалазином.

Таблица 1

Двигательно-исследовательская активность крыс при пероральном введении микрочастиц EUDRAGIT® RL 30 крысам в течение 7 дней

3 п.п	Группы животных	Двигательная активность (число пересеченных линий)	P	Исследовательская активность (количество заглядываний в отверстия)	P
1	Микрочастицы EUDRAGIT® RL 30 3000 мг/кг	45 ± 7	<0, 05	23 ± 5	<0, 05
2	Контроль	51 ± 6		19 + 4	

Результаты исследования противовоспалительной активности показали, что введение TNBS крысам в 100 % случаев вызывало появление крови в фекалиях, существенное снижение (до 15 % от исходной) массы тела (табл. 2). У животных, которые в течение 5 дней получали перорально ПЛК, снижение массы тела было значительно меньше (до 5 %) по сравнению со всеми опытными группами, в том числе с группой крыс, которым вводили субстанцию MS. Кроме того, при введении ПЛК наличие в фекалиях крови было отмечено только у 1 крысы.

Таблица 2

Динамика массы тела крыс и некоторые стороны клинической картины при развитии воспаления толстого кишечника, вызванного TNBS

№ пп	Группы животных	Средняя масса крыс в 1-й день эксперимента (M + m)	Средняя масса крыс на 6 день эксперимента (M + m)	Наличие крови в фекалиях на 6-й день эксперимента: (+) – у одной крысы + + + + + - у 6-ти крыс
1	Контроль (TNBS)	228 ± 11	195 ± 10*	+ + + + +
2	TNBS + RL	230 ± 14	200 ± 8*	+ + + + +
3	TNBS + субстанция MS	227 ± 12	200 ± 9*	+ + + + +
4	TNBS + ПЛК	230 ± 17	220 ± 11	+
5.	Контроль (интактные)	223 ± 15	230 ± 17	-

Примечание: * – разница достоверна при $p < 0,05$.

Анализ результатов при определении активности маркеров воспалительной реакции МРО и МДА (табл. 3) по сравнению с другими группами крыс (на 54 % при $p < 0,05$), что свидетельствует о выраженном противовоспалительном эффекте при введении этого комплекса. Внеклеточная МРО является показателем активации нейтрофилов при различных воспалительных процессах, включая воспалительные заболевания кишечника, и определение ее содержания используется для оценки уровня воспаления в толстом кишечнике и эффективности лекарственных препаратов [10,7]. Значения уровня МРО при введении субстанции MS, что было очевидно, практически не отличались от таковых значений контрольных крыс. Аналогичная картина наблюдалась и при сравнении концентрации МДА во всех экспериментальных группах животных: наименьшие значения этого показателя были отмечены при введении крысам образца ПЛК с месалазином, что подтверждает противовоспалительную эффективность этой композиции.

Таблица 3

Концентрация миелопероксидазы и малонового диальдегида в гомогенате толстого кишечника крыс при воспалении, вызванном введением TNBS

№ пп	Группы животных	Концентрация МРО M ±m (мкМ/мг)	Концентрация МДА M ±m (мкМ/г)
1	Контроль (TNBS)	0,144±0,0061*	0,88 ±□0,039*
2	TNBS + RL/C71G 5:1	0,141±0,014*	0,78 ±0,018*
3	TNBS + субстанция MS	0,101 ±0,004*	0,64 ±□0,013*
4	TNBS + ИПК-1	0,067±0,003**	0,54 ±0,07,2**
5	Контроль (интактные)	0,0274±0,0008	0,64 ±□0,011

* – разница достоверна при $p < 0,05$ по отношению к контролю (интактные).

** – разница достоверна при $p < 0,05$ по отношению к контролю (TNBS).

Известно, что эффективность месалазина проявляется только при его высокой местной концентрации в кишечнике, но при приеме внутрь чистый месалазин быстро и практически полностью метаболизируется до неактивного метаболита – N-ацетил-5-АСК, который всасывается в кровь и выводится почками, не достигая места локализации воспалительного процесса в кишечнике. Этим и объясняется неэффективность MS на модели колита у крыс. Создание защиты MS от инактивации в верхних отделах кишечника с использованием комплекса RL/MS обеспечивает доставку 5-АСК в область локализации воспаления и тем самым обеспечивает его противовоспалительную активность. Полученные нами данные коррелируют с результатами, полученными ранее *in vitro*, показавшими

способность комплекса пролонгировано высвобождать MS в течение 8 часов, начиная с pH=5,8 до pH=7,0. Полученные результаты могут иметь высокую прогностическую значимость для последующей разработки на основе комплекса RL/MS инновационной лекарственной формы месалазина, которая может обеспечивать доставку как в дистальные отделы тонкого кишечника, так и в область толстого кишечника. Кроме того, разработанная система может быть эффективной и при закислении внутрикишечной среды.

Выводы:

1. Полимер-лекарственный комплекс с месалазином (ПЛК) в виде микрочастиц состава EUDRAGIT® RL 30 D/месалазин в соотношении 1:2 при 5-дневном применении крысам уменьшает симптомы колита, вызванного введением через прямую кишку 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS): предотвращает существенное снижение массы тела и появление крови в фекалиях крыс.
2. ПЛК состава EUDRAGIT® RL 30 D/месалазин, вводимый в течение 5 дней крысам с моделью колита, вызванного ректальным введением TNBS, снижает в гомогенате толстой кишки уровень маркеров воспаления – миелопероксидазы (MPO) и малонового диальдегида (МДА).
3. Результаты исследования безопасности и противовоспалительной активности ПЛК RL/MS свидетельствуют о перспективности его дальнейшей разработки и создания на его основе инновационной лекарственной формы для направленной доставки месалазина (5-АСК) в зоны воспалительного процесса при колитах и болезни Крона.

Исследования поддержаны грантом Российского Научного Фонда № 14-15-01059.

Список литературы

1. Мустафин Р.И., Кабанова Т.В., Сёмина И.И., Буховец А.В., Гарипова В.Р. Биофармацевтическая оценка поликомплексной матричной системы доставки в толстый отдел кишечника на основе Carbomer 940/Eudragit® EPO/ // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 8. – С.41–44.
2. Мустафин Р.И., Гарипова В.Р., Семина И.И. [и др.]. Сравнительное исследование поликомплексов на основе Carbopol и противоположно-заряженных полиэлектролитов как новых систем пероральной доставки // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 1. – С.3–8.
3. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Современные методы в биохимии // Медицина. – Москва, 1977. – С. 66–68.

4. Bondesen S. Intestinal fate of 5-aminosalicylic acid: regional and systemic kinetic studies in relation to inflammatory bowel disease. *Pharmacol Toxicol.* 1997; 81 Suppl 2:1–28.
5. Bradley P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78(3):206–9.
6. Fallingborg J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan Med Bull.* 1999 Jun; 46(3):183-96.
7. Fedorak R.N. et al. Colonic delivery of dexamethasone from a prodrug accelerates healing of colitis in rats without adrenal suppression. *Gastroenterology.* 1995; 108(6):1688–99.
8. Friedman G. Sulfasalazine and new analogues. *Am J. Gastroenterol.* 1986;81(2):141–4.
9. Klotz U. Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine, its metabolites and other prodrugs of 5-aminosalicylic acid. *Clin. Pharmacokinet.* 1985; 10(4):285–302.
10. Krawisz J.E., Sharon P., Stenson W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984; 87(6):1344–50.
11. Kruis W., Kiudelis G., et al. Once daily versus three times daily mesalazine granules in active ulcerative colitis: a double-blind, double-dummy, randomized, noninferiority trial. *Gut* 2009; 58(2):233–40.
12. Layer P.H. et al. Delivery and fate of oral mesalamine microgranules within the human small intestine. *Gastroenterology.* 1995 May; 108(5):1427-33.
13. Sandborn W.J. et al. MMX Multi Matrix System® mesalazine for the induction of remission in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis: a combined analysis of two randomized, double-blind, placebo-controlled trials *Aliment Pharmacol Ther* 26, 205–215, 2007.
14. Sujata P. Sawarkar, S.G. Deshpande, A.N. Bajaj, and V.S. Nikam. In Vivo Evaluation of 5-ASA Colon-Specific Tablets Using Experimental-Induced Colitis Rat Animal Model. *AAPS PharmSciTech*, 2015. Vol. 16. No. 6.