

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ИЗМЕНЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ n-(1-ФЕНЭТИЛ-4-ПИПЕРИДИЛ)-ПРОПИОНАНИЛИДА ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В ПЛГА-НАНОЧАСТИЦЫ

М. А. Тюнин, Т. М. Корнюхина, А. С. Никифоров, В. Н. Быков, С. В. Чепур¹

Определены технологические параметры для эффективного включения в полилактид-ко-гликолидные (ПЛГА) наночастицы n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида методом нанопреципитации. В эксперименте на крысах-самцах установлено, что n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид (200 мкг/кг, внутримышечно) в составе ПЛГА-наносфер в зависимости от соотношения адсорбированной на поверхности частиц и связанной с полимером фракций препарата вызывает уменьшение скорости развития и увеличение продолжительности сна. ПЛГА-наночастицы с n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилидом при величине связанной с полимером фракции препарата от 40 до 60 % обеспечивают увеличение продолжительности действия в 1,6–2 раза, а при величине связанной фракции 60–80 % — в 2,2–2,6 раза. Аналогичное увеличение продолжительности действия n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в свободной форме достигается при его введении в дозах 400–500 мкг/кг.

Ключевые слова: n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид; полилактид-ко-гликолид; наночастицы

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время полимерные биodeградируемые нано- и микросферы рассматриваются в качестве перспективных систем доставки фармакологически активных веществ (ФАВ) как при инъекционных, так и неинъекционных путях введения [4, 9, 11]. Мобилизация ФАВ на полимерные частицы позволяет контролировать скорость и профиль высвобождения, способствует снижению выраженности побочных реакций, повышает биодоступность [5, 8]. При этом, в отличие от традиционных лекарственных форм, профиль высвобождения ФАВ в организме характеризуется поддержанием относительно стабильной концентрации в тканях в течение длительного времени без резких колебаний вне терапевтического диапазона [6]. Наиболее широкое распространение в качестве полимерной основы для получения нано(микро)частиц получили полимеры — производные молочной и гликолевой кислот (полилактид, полилактид-ко-гликолид) [10]. Основными преимуществами этих полимеров являются их универсальность с точки зрения включения как гидрофильных, так и липофильных ФАВ, оптимальные сроки биodeградации, низкая токсичность и разрушение в организме с образованием естественных метаболитов (гликолевой и молочной кислоты) [7].

Высокий интерес к полимерным нано- и микрочастицам связан с их возможным применением в качестве носителей ФАВ, отличающихся коротким периодом полувыведения и узким безопасным диапазоном доз. В частности, к таким препаратам относится опиоидный аналь-

гетик n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид, который обладает высокой анальгетической активностью и используется в целях обезболивания и анестезии [1, 3]. По нашему мнению, возможным решением проблемы повышения его эффективности и безопасности может стать использование систем доставки на основе полилактид-ко-гликолидных (ПЛГА) наночастиц. В связи с этим была сформулирована задача настоящего исследования, которая заключалась в получении ПЛГА-наночастиц, содержащих n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид, и исследовании их фармакологической активности в сравнении с традиционной лекарственной формой препарата (раствор для внутримышечного введения).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЛГА-наночастицы, содержащие n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид (ФГУП ГосНИИОХТ, Россия) получали методом нанопреципитации. Для получения полимерных наночастиц использовали ПЛГА (“Sigma”, США) с соотношением мономеров лактид/гликолид 50:50 и молекулярной массой 5–15 и 40–75 кДа. Суспензию наночастиц получали в результате добавления раствора ПЛГА и n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в ацетоне (раствор V1) в водный раствор сурфактанта плуроника F-68 (раствор V2) при постоянном перемешивании со скоростью 500 об/мин. После выпаривания ацетона наночастицы выделяли путем трехкратного центрифугирования и промывания в дистиллированной воде. Выделенные наночастицы ресуспензировали и подвергали лиофильной сушке.

Для качественного анализа полученных образцов определяли размер частиц методом динамического светорассеивания на анализаторе Nanotracs (“Microtracs”,

¹ Научно-исследовательский испытательный институт (военной медицины) Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4.

США). Количественный анализ включал определение общего содержания препарата в образце, а также его адсорбированного на поверхности частиц и связанного с полимерной матрицей количеств. Количественный анализ выполняли методом газовой хроматографии на хроматографе Shimadzu GC-2010 (Япония).

На основании данных количественного анализа рассчитывали показатель эффективности включения по формуле:

$$\text{Эффективность включения} = \frac{C_{\text{общ}}}{C_{\text{теор}}} \cdot 100\%,$$

где $C_{\text{общ}}$ — общее содержание препарата в образце, %; $C_{\text{теор}}$ — теоретическое содержание препарата при условии включения всего использованного в опыте количества, %.

Фармакологическую активность полученных образцов ПЛГА-наночастиц исследовали в эксперименте на белых нелинейных крысах-самцах массой 200 – 220 г (Рапполово). Для выявления изменений фармакологической активности *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида у крыс регистрировали время наступления и длительность сна по наличию рефлекса переворачивания. В качестве образца сравнения использовали водный раствор препарата в свободной форме. Препарат сравнения и образцы наночастиц вводили внутримышечно из расчета 1 мл на 1 кг массы. Перед введением образцы наночастиц ресуспендировали в 1 % растворе карбоксиметилцеллюлозы.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартных параметрических методов [2] с использованием программы Statistica+ 2005 и Excel 2007 для Windows. Статистическую значимость результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе лабораторных экспериментов было приготовлено 10 образцов ПЛГА-наночастиц. Для определения наиболее оптимальных условий для включения *n*-(1-фе-

нэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в наночастицы изменяли концентрацию полимера в органической фазе, pH водной фазы, концентрацию плуроника F-68 в водной фазе, соотношение объемов органической и водной фаз. Основные условия получения исследованных образцов ПЛГА-наночастиц представлены в табл. 1.

При измерении размера частиц для всех образцов наблюдали унимодальный характер распределения показателя, а средний размер частиц составил от 200 до 400 нм.

Результаты количественного анализа (табл. 2) позволили определить влияние технологических параметров на эффективность включения *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в ПЛГА-наночастицы. Из данных, представленных в табл. 2, видно, что эффективность включения для образцов из ПЛГА 5 – 15 кДа составила 9,1 – 35,7 %, в то время как для образцов из ПЛГА 40 – 75 кДа — только 2,2 – 11,1 %. Выраженное влияние на эффективность включения оказывало соотношение органической и водной фаз, концентрация ПЛГА в органической фазе, pH водной фазы и содержание плуроника F-68. У образцов, приготовленных из полимера с молекулярной массой 5 – 15 кДа, эффективность включения возрастала с 9,1 до 23,1 % (образцы № 1, 4, 5) при изменении соотношения органической и водной фаз с 1/10 до 1/2. У образцов, приготовленных из ПЛГА 40 – 75 кДа, наблюдали аналогичную зависимость. Эффективность включения возрастала с 2,5 до 11,5 % при изменении соотношения фаз с 1/4 до 1/2 (образцы № 7, 9, 10). Соотношение фаз 1/5 и 1/10 не использовали для получения наночастиц из ПЛГА 40 – 75 кДа, так как при таких условиях происходило интенсивное слипание полимера в крупные полиморфные конгломераты. Для образцов наночастиц из ПЛГА 5 – 15 кДа снижение содержания плуроника F-68 с 1 % до 0,5 % (образец № 2) и увеличение pH водной фазы с 7,0 до 9,0 (образец № 3) сопровождалось увеличением эффективности включения с 9,1 % до 18,8 и 35,7 % соответственно.

При анализе влияния технологических условий на распределение адсорбированной и связанной фракций

Таблица 1. Основные технологические условия получения образцов ПЛГА-наночастиц, содержащих *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид

№ образца	Молекулярная масса ПЛГА	Содержание ПЛГА в растворе V1, %	Содержание препарата в растворе V1, %	Содержание плуроника F-68 в растворе V2, %	Объемное соотношение V1/V2	pH раствора V2
1	5 – 15 кДа	4	0,4	1	1/10	7,0
2	5 – 15 кДа	4	0,4	0,5	1/10	7,0
3	5 – 15 кДа	4	0,4	0,5	1/10	9,0
4	5 – 15 кДа	4	0,4	1	1/5	7,0
5	5 – 15 кДа	4	0,4	1	1/2	7,0
6	40 – 75 кДа	1	0,1	1	1/2	7,0
7	40 – 75 кДа	2	0,1	1	1/2	7,0
8	40 – 75 кДа	4	0,1	1	1/2	7,0
9	40 – 75 кДа	2	0,1	1	1/3	7,0
10	40 – 75 кДа	2	0,1	1	1/4	7,0

Таблица 2. Результаты качественного и количественного анализа образцов ПЛГА-наночастиц, содержащих *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид

№ образца	Средний размер частиц, нм	Общее содержание, %	Адсорбированная фракция, %	Связанная фракция, %	Эффективность включения, %
ПЛГА 50:50, 5 – 15 кДа					
1	351	0,83	68,7	31,3	9,1
2	382	1,71	22,8	77,1	18,8
3	400	3,25	18,7	81,2	35,7
4	325	1,30	40,7	59,2	14,3
5	268	2,10	36,1	63,8	23,1
ПЛГА 50:50, 40 – 70 кДа					
6	196	0,20	55,0	45,0	2,2
7	255	0,53	37,7	62,3	11,1
8	354	0,06	50,0	50,0	5,6
9	276	0,71	57,1	47,9	7,5
10	302	0,47	87,2	12,7	2,5

установлено, что степень адсорбции *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида, главным образом, зависит от объемного соотношения ацетон/вода, концентрации сурфактанта в водной фазе и pH водной фазы. Для образцов из ПЛГА 5 – 15 кДа увеличение соотношения фаз от 1/2 до 1/10 вызывало повышение доли адсорбированного количества с 38 – 40 % до 68 % (образцы № 1, 4, 5). При использовании высокомолекулярного полимера величина адсорбированной фракции препарата была значительно выше, при этом увеличение соотношения ацетон/вода сопровождалось усилением адсорбции с 37 до 87 % (образцы № 7, 9, 10).

На основании полученных данных оптимальными условиями для наиболее эффективного включения *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в ПЛГА-наночастицы были определены: ПЛГА 5 – 15 кДа с соотношением мономеров 50:50, концентрация ПЛГА в ацетоне 4 %, объемное соотношение ацетон/вода 1:10, концентрация плуроника F-68 в водной фазе 0,5 %, pH водной фазы 9,0.

Фармакологическую активность *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в составе ПЛГА-наночастиц исследовали при внутримышечном пути введения. Препарат в свободной форме вводили в дозах 100, 200, 300, 400 и 500 мкг/кг. При введении препарата в данном диапазоне доз у крыс наблюдали дозозависимое увеличение скорости наступления и продолжительности сна (табл. 3).

Образцы ПЛГА-наночастиц вводили в количествах, соответствующих дозе опиоидомиметика 200 мкг/кг. Для выявления изменений временных параметров наблюдаемого эффекта при введении опиоидомиметика в составе ПЛГА-наносфер регистрируемые показатели сравнивали с группой животных, которым вводили эквивалентную дозу препарата в неконъюгированной форме.

При введении образцов наночастиц из ПЛГА 5 – 15 кДа регистрировали достоверное увеличение продолжительности сна в 1,7 – 2,6 раза. Наиболее продолжительный эффект наблюдали после введения образца № 2 ($87,7 \pm 6,32$ мин) и № 3 ($105,4 \pm 2,84$ мин), что соответствовало таковой при введении препарата в неконъюгированной форме в дозе 400 – 500 мкг/кг. Длительность сна на фоне введения образцов № 1, 4, 5 достигала 60 – 80 мин, что по продолжительности действия было эквивалентно введению свободной формы препарата в дозе 300 – 400 мкг/кг. Помимо пролонгации, для образцов № 2 – 5 отмечали замедленное наступление эффекта (7 – 10 мин), в то время как при введении препарата в неконъюгированной форме — через $4,8 \pm 0,38$ мин.

При рассмотрении зависимости времени развития регистрируемых признаков от количественных характеристик образцов ПЛГА-наночастиц установлено, что замедленное наступление эффекта характерно только для образцов, у которых величина адсорбированной на поверхности частиц фракции препарата не более 41 %.

Таблица 3. Временные характеристики сна у крыс-самцов при введении *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в неконъюгированной форме и в составе комплекса с ПЛГА-наночастицами ($M \pm m$, $n = 6$)

Образец, доза	Количественные параметры		Время наступления сна, мин	Длительность сна, мин
	Адсорбированная фракция, %	Связанная фракция, %		
<i>n</i> -(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид, водный раствор (неконъюгированная форма)				
100 мкг/кг	–	–	$8,7 \pm 0,79$	$14,3 \pm 1,46$
200 мкг/кг	–	–	$4,8 \pm 0,38$	$40,6 \pm 4,58$
300 мкг/кг	–	–	$4,3 \pm 0,40$	$61,2 \pm 9,24$
400 мкг/кг	–	–	$3,5 \pm 0,20$	$85,9 \pm 6,26$
500 мкг/кг	–	–	$2,7 \pm 0,10$	$111,2 \pm 6,82$
<i>n</i> -(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид/ПЛГА, 5 – 15 кДа, 200 мкг/кг				
№ 1	68,7	31,3	$5,5 \pm 0,32$	$61,7 \pm 5,07^{**}$
№ 2	22,9	77,1	$9,8 \pm 0,50^{***}$	$87,7 \pm 6,32^{***}$
№ 3	18,8	81,2	$8,7 \pm 0,80^{**}$	$101,5 \pm 6,37^{***}$
№ 4	40,8	59,2	$6,8 \pm 0,71^*$	$72,7 \pm 7,24^{**}$
№ 5	36,2	63,8	$6,5 \pm 0,53^*$	$81,3 \pm 7,84^{***}$
<i>n</i> -(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид/ПЛГА 40 – 70 кДа, 200 мкг/кг				
№ 6	55,0	45,0	$5,3 \pm 0,27$	$83 \pm 9,46^{**}$
№ 7	37,7	62,3	$5,8 \pm 0,36$	$100,3 \pm 9,40^{***}$
№ 8	50,0	50,0	$8,8 \pm 1,15^{**}$	$71,2 \pm 10,95^*$
№ 9	57,1	42,9	$7,9 \pm 1,03^*$	$69,0 \pm 9,03^*$
№ 10	87,3	12,7	$5,6 \pm 0,47$	$42,2 \pm 4,95$

Примечания:

1. * — различия с группой, где вводили неконъюгированную форму *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в дозе 200 мкг/кг, достоверны при $p < 0,05$;

2. ** — различия с группой, где вводили неконъюгированную форму *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в дозе 200 мкг/кг, достоверны при $p < 0,01$;

3. *** — различия с группой, где вводили неконъюгированную форму *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в дозе 200 мкг/кг, достоверны при $p < 0,001$.

Сопоставление длительности эффекта с величиной связанной фракции показало, что максимальную продолжительность действия опиоидомиметика регистрировали после введения образцов с величиной связанной фракции 77 – 81,2 %. На фоне введения других образцов, где количество связанной фракции составляло 30 – 64 %, пробуждение у животных отмечали через 60 – 80 мин.

Включение *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в наночастицы из ПЛГА 40 – 70 кДа также сопровождалось увеличением продолжительности сна в 1,5 – 2,4 раза, что соответствовало введению свободной формы препарата в дозе 300 – 400 мкг/кг. Наиболее длительный эффект отмечали у образца № 7 (101,8 ± 11,28 мин). На фоне введения образцов № 7 и 8, помимо увеличения продолжительности, наблюдали достоверное снижение скорости наступления эффекта (8 – 9 мин). При введении остальных образцов отмечали тенденцию к замедленному развитию эффекта, однако выявленные изменения были статистически не значимы.

Анализ зависимости временных параметров развития эффекта от количественных характеристик образцов позволил выявить, что продолжительность действия опиоидомиметика увеличивается в 2,4 раза при величине связанной фракции не менее 60 %. При величине связанной фракции 40 – 50 % продолжительность эффекта увеличилась в 1,6 – 2 раза.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об изменении временных параметров фармакологического действия *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида при включении в ПЛГА-наносферы. В зависимости от количества адсорбированной на поверхности частиц и связанной с полимером фракции препарата развитие фармакологического эффекта носит замедленный и пролонгированный характер. ПЛГА-наночастицы с содержанием связанной с полимером фракции препарата от 40 до 60 % обеспечивают увеличение продолжительности действия препарата в 1,6 – 2 раза, а с содержанием связанной фракции 60 – 80 % — в 2,2 – 2,6 раза. Учитывая, что соразмерное увеличение продолжительности действия препарата в неконъюгированной форме наблюдается при повышении дозы в 1,5 – 2,5 раза, применение ПЛГА-наносфер размером от 200 до 400 нм в качестве системы доставки следует считать перспективным для

повышения эффективности и безопасности *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида.

ВЫВОДЫ

1. Включение *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в полилактид-ко-гликолидные (ПЛГА) наночастицы в зависимости от количественного распределения препарата между поверхностью и полимерной основой частиц обеспечивает увеличение времени наступления и продолжительности сна в 1,6 – 2,6 раза.

2. Использование ПЛГА-наночастиц размером 200 – 400 нм в качестве носителя *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида позволяет снизить дозу препарата в свободной форме в 1,5 – 2,5 раза для достижения эквивалентного по продолжительности фармакологического эффекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. Батунова, К. Якимова, *Фармакол. и токсикол.*, **54**(1), 21 – 23 (1991).
2. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград (1963).
3. П. В. Смольников, *Полный справочник обезболивающих и вспомогательных препаратов*, 2-е изд., Мир и Образование, Москва (2003).
4. I. Bala, S. Hariharan, M. N. V. Kumar, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **21**(5), 387 – 422 (2004).
5. W. H. De Jong, P. J. Borm, *Int. J. Nanomedicine*, **3**(2), 133 – 149 (2008).
6. U. Edlund, A.-C. Albertsson, *Degradable Aliphatic Polyesters: Series: Advances in Polymer Science*, V. 157, Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg (2002), 67 – 112.
7. D. H. Lewis, M. Chasin, R. Lagner, *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York (1990), 1 – 41.
8. A. Manmode, M. Sakarkar, N. M. Mahajan, P. P. DeLuca, *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, **1**(4), 1020 – 1027 (2009).
9. H. M. Mansour, Y-S. Rhee, X. Wu, *Int. J. Nanomedicine*, **4**, 299 – 319 (2009).
10. H. M. Mansour, M. J. Sohn, A. Al-Ghananeem, *Int. J. Mol. Sci.*, **11**(9), 3298 – 3322 (2010).
11. N. K. Vard, D. W. Pack, *Expert opinion on biological therapy*, **4**(1), 35 – 51 (2004).

Поступила 17.04.12

PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF *n*-(1-PHENETHYL-4-PIPERIDYL)PROPIONANILIDE MODIFIED BY ENCAPSULATION IN PLGA NANOPARTICLES

M. A. Tyunin, T. M. Kornukhina, A. S. Nikiforov, V. N. Bykov, and S. V. Chepur

Experimental Research Institute of Military Medicine, Military Medical Academy, ul. Lesoparkovaya 4, St. Petersburg, 195043, Russia

Technological parameters for the effective encapsulation of *n*-(1-phenethyl-4-piperidyl)propionanilide in poly(lactid-co-glycolide) (PLG) nanoparticles have been determined. Depending on the ratio of drug fractions adsorbed on the particle surface and associated with the polymer matrix, *n*-(1-phenethyl-4-piperidyl)propionanilide (200 µg/kg, i/m) loaded PLG nanospheres accelerated time onset and increased duration of sleep in rats: by a factor of 1.6 – 2.0 for polymer associated drug fraction within 40 – 60% and by a factor of 2.2 – 2.6 for polymer associated drug fraction within 60 – 80%. A similar increase of sleep duration was observed when free *n*-(1-phenethyl-4-piperidyl)-propionanilide was administered at doses within 400 – 500 µg/kg.

Keywords: *n*-(1-phenethyl-4-piperidyl)propionanilide; poly(lactide-co-glycolide); nanoparticles