

УДК 678.664:615-453:611.018

Дослідження ефективності полімерних лікарських форм НПЗП на основі сегментованих поліуретанових еластомерів *in vivo*

Р.А. Рожнова, Н.А. Галатенко, О.С. Савицька, Л.Ю. Нечаєва, Е.Г. Левенець

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України
48, Харківське шосе, Київ, 02160, Україна

Встановлено, що ефективна дія полімерних лікарських форм, яка містить піроксикам, полягає в зменшенні запальних процесів при імплантації та місцевому інгібуванні процесів судиноутворення. Найбільша стимуляція гуморального імунітету припадає на 1 та 3 добу імплантації, що відповідає найбільш інтенсивному проникненню піроксикаму в навколишні тканини.

Одне з першочергових завдань при створенні полімерних імплантаційних матеріалів, які мають місцеву лікувальну дію, – оцінка їх ефективності з використанням різних фізико-хімічних і біологічних методів дослідження. При розробці полімерних лікарських форм у вигляді імплантаційного матеріалу цей процес доцільно оцінювати шляхом вивчення динаміки вивільнення лікарських препаратів у середовища, які імітують внутрішнє середовище організму, з наступним вивченням реакції навколишньої тканини на імплантований матеріал, що дасть змогу спрогнозувати поведінку полімерного матеріалу при застосуванні за призначенням, його місцеву лікувальну дію.

Відомо [1, 2], що один із важливих прогностичних показників при великих пухлинах – ангіогенез або судиноутворення. Пухлина для свого росту потребує постійного утворення судин, що забезпечує достатнє живлення та видалення продуктів життєдіяльності. Проростання судин у пухлини дає змогу клітинам проникати в кровотік і метастазувати в інші органи та тканини. Кількість і густина мікросудин у пухлинах відповідає потенційній здатності пухлинних клітин проникати у кров і формувати метастази. На сьогодні в клініці вивчається близько 40 препаратів, які інгібують різні ланки ангіогенезу [3].

Піроксикам (ПК) 4-гідрокси-2-метил-N-2-2-піридиніл-2Н-1,2-бензотіазин-3-карбоксамід-1,1-діоксид – нестероїдний лікарський препарат, який відомий як інгібітор ангіогенезу. Введення піроксикаму до структури полімерного носія дасть змогу отримати новий імплантаційний матеріал, використання якого як виробу медичного призначення в місці видаленої патології дасть змогу не тільки відновити уражену ділянку, а й отримати лікувальний ефект.

Раніше нами були проведені дослідження [4] з розробки пролонгованих форм (ППФ) нестероїдних

протизапальних препаратів (НПЗП) на основі сегментованих поліуретанових еластомерів, вивчені їхні фізико-хімічні та фізико-механічні властивості, досліджений вплив лікарських препаратів у структурі полімерного носія на перебіг процесу біодеградації. Однак, для отримання найбільш повної інформації про розроблені полімерні матеріали, з метою подальшого використання за призначенням, необхідно дослідити їх ефективність.

Метою даної роботи є оцінка ефективності розроблених полімерних лікарських форм НПЗП *in vivo* шляхом дослідження динаміки вивільнення нестероїдного протизапального лікарського препарату піроксикаму з полімерних лікарських форм пролонгованої дії та впливу хімічної структури полімерного носія на перебіг цього процесу, вивчення процесів інгібування судиноутворення навколо полімерного імплантату з іммобілізованим інгібітором ангіогенезу.

Експериментальна частина.

Об'єкти дослідження: сегментовані поліуретанові еластомери (СПЕ) синтезовані на основі поліоксипропіленгліколю (Rokopol 1000, Польща), 2,4;2,6-толуїлендіізоціанату (ТДІ 80/20, Bayer), 1,4-бутандіолу (БД, Merck) і лактозовмісного мономеру 4,4'-дифенілметандіуретанлактози (ДФМДУЛ) [5].

Для спектrophотометричних досліджень використовували зразки у вигляді плівок діаметром 5 см: Р16-5П складу ТДІ-ПОПГ-БД і Л10(2)-5П складу ТДІ-ПОПГ-БД-ДФМДУЛ, в яких кількість ПП складала 5 % від ваги полімерного носія, що не перевищувало його фармакологічної дози. Для виконання роботи був застосований піроксикам, виділений з таблетованої форми (Piroxicam, Biopharma, Болгарія) за методикою [6] ($C_{15}H_{13}N_3O_4S$, ММ = 331,35).

Для спектrophотометричного дослідження зразки

полімерів з іммобілізованим піроксикамом Р16-5П і Л10(2)-5П (дослідні) та зразки Р16 і Л10(2) (контрольні) субкутально імплантували експериментальним тваринам (білі щури) на термін 1, 3, 7, 14 і 30 діб. Після зазначених термінів тварин забивали передозуванням сірчаном ефіром, зразки виймали, промивали дистильованою водою, висушували до постійної ваги.

Гістологічні дослідження проводили на білих щурах (самці). Експериментальний матеріал полімерних імплантатів Р16-5П і Л10(2)-5П субкутально імплантували в ділянку спини на термін 1, 3, 14 і 30 діб. Тварин забивали передозуванням сірчаного ефіру. Полімерні зразки з навколишньою сполучнотканиною капсулою поміщали в 10–12 %-вий нейтральний формалін. Обробка проводилась за загальновідомою методикою. Матеріал фарбували гематоксилін-еозином.
Спектрофотометричне дослідження динаміки вивільнення ППР з полімерних лікарських форм in vivo

Відомо багато високочутливих методів визначення НПЗП у біологічних рідинах, тканинах, різних фармакологічних формах з використанням методів високочутливої рідинної хроматографії (ВЕРХ) [7], флюорометричного [8] і спектрофотометричних [9] методик. Всі згадані методи дослідження належать до НПВП, які застосовують перорально.

Динаміку вивільнення водорозчинних лікарських препаратів з полімерних носіїв вивчають з використанням спектрофотометричних методик [10, 11] і ВЕРХ [12], де як модельне середовище вивільнення використовують дистильовану воду або фізіологічний розчин. Дослідження динаміки вивільнення піроксикаму з полімерного носія in vitro неможливе в зв'язку з його нерозчинністю у воді [13], адже вивільнення піроксикаму з полімерної лікарської форми при імплантації відбувається під впливом внутрішнього середовища організму, з підключенням складних ферментативних систем.

Запропоновано [9] простий та вибірково спектрофотометричний метод кількісного визначення піроксикаму в таких фармакологічних формах як капсули та таблетки. Методика основана на утворенні йонпарних комплексів при взаємодії лікарських препаратів з барвниками – алізарином, алізариновим червоним S, алізариновим жовтим G, хіналізарином з наступним їх вимірюванням при оптимальних довжинах хвиль. Закон Бера підтверджувався при концентраціях у межах 0,05–2,40 мкг/мл.

Враховуючи результати, отримані Alaa S. Amin [9], динаміку вивільнення ППР вивчали шляхом спектрофотометричного визначення піроксикаму в полімерних лікарських формах після їх імплантації експериментальним тваринам, який заснований на утворенні забарвлених продуктів взаємодії досліджуваної речовини з органічним барвником (йонних асоціатів) у

середовищі органічного розчинника з наступним їх фотометруванням. Кількість лікарського препарату, що вивільнився в оточуюче імплантат середовище, розраховували за різницею між відомою кількістю піроксикаму, введеною в полімерний носій до імплантації та його кількістю після імплантації знайденого за калібрувальним графіком.

Як комплексоутворювач у роботі був застосований алізариновий жовтий (Merck, Німеччина).

Для побудовання калібрувального графіка були використані розчини піроксикаму в ДМФА таких концентрацій: $0,1 \cdot 10^{-3}$, $0,5 \cdot 10^{-3}$, $1,0 \cdot 10^{-3}$, $1,5 \cdot 10^{-3}$ і $2,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Маточний розчин алізарину з концентрацією $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л був приготовлений розчиненням 0,309 г алізарину в 50 мл ДМФА.

По 1 мл розчину кожної концентрації наливали в мірні флакони по 10 мл. У кожен флакон з розчином піроксикаму в ДМФА був добавлений стоковий розчин алізарину з розрахунку, щоб на одну молекулу піроксикаму припадала одна молекула алізарину.

Спектри поглинання отриманих розчинів реєстрували на спектрофотометрі SPECORD M-40 у кюветках з товщиною шару 10 мм. Абсорбційні спектри піроксикаму та його комплекси з алізарином були зняті з максимумом смуги поглинання при $\lambda = 393\text{--}407$ нм проти розчину порівняння ДМФА.

Закон Буггера-Ламберта-Бера зберігається в інтервалі концентрацій $0,1 \cdot 10^{-3}\text{--}2,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Молярний коефіцієнт екстинкції йонного асоціата при $\lambda = 400$ нм, розрахований з калібрувального графіка, дорівнює ~ 600 .

Для вивчення динаміки вивільнення піроксикаму з полімерних лікарських форм при імплантації експериментальним тваринам протягом 1, 3, 7, 14 і 30 діб були приготовлені робочі розчини в ДМФА полімерних зразків з іммобілізованим ППР (зразки після імплантації) з концентрацією піроксикаму $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Як розчини порівняння використовували розчини полімерів Р16 і Л10(2) в ДМФА. Таким чином,

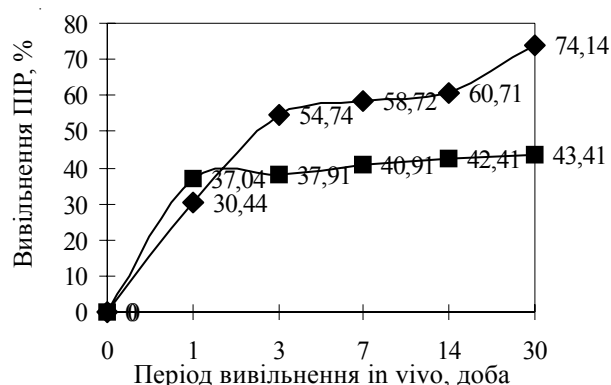


Рис. 1. Динаміка вивільнення ППР з полімерних лікарських форм в організм експериментальних тварин при імплантації

Таблиця 1. Вивільнення піроксикаму з полімерної лікарської форми на основі ПОПГ-ТДІ-БД

| Період імплантації, доба | Кількість ППР у зразках до імплантації, г | Оптична густина, D | Кількість ППР за калібрувальним графіком, моль, 10^3 | Кількість ППР у полімерній лікарській формі після імплантації, | | Кількість ППР, що вивільнився, | |
|--------------------------|---|----------------------|--|--|--------|--------------------------------|-------|
| | | | | моль, 10^3 | г | г | % |
| 1 | 0,027 | 0,6628 | 1,26 | 0,051 | 0,0170 | 0,0100 | 37,04 |
| 3 | 0,027 | 0,6501 | 1,25 | 0,050 | 0,0168 | 0,0102 | 37,91 |
| 7 | 0,027 | 0,6121 | 1,18 | 0,048 | 0,0159 | 0,0110 | 40,91 |
| 14 | 0,027 | 0,5939 | 1,15 | 0,047 | 0,0155 | 0,0115 | 42,41 |
| 30 | 0,027 | 0,5931 | 1,13 | 0,046 | 0,0153 | 0,0117 | 43,41 |

Таблиця 2. Вивільнення піроксикаму з полімерної лікарської форми на основі ПОПГ-ТДІ-ТДУЛ-БД

| Період імплантації, доба | Кількість ППР у зразках до імплантації, г | Оптична густина, D | Кількість ППР за калібрувальним графіком, моль, 10^3 | Кількість ППР у полімерній лікарській формі після імплантації, | | Кількість ППР, що вивільнився, | |
|--------------------------|---|----------------------|--|--|--------|--------------------------------|-------|
| | | | | моль, 10^3 | г | г | % |
| 1 | 0,018 | 0,7340 | 1,40 | 0,0378 | 0,0125 | 0,0055 | 30,44 |
| 3 | 0,018 | 0,4717 | 0,91 | 0,0246 | 0,0081 | 0,0099 | 54,74 |
| 7 | 0,018 | 0,4351 | 0,83 | 0,0224 | 0,0074 | 0,0106 | 58,72 |
| 14 | 0,018 | 0,4092 | 0,79 | 0,0214 | 0,0071 | 0,0109 | 60,71 |
| 30 | 0,018 | 0,2705 | 0,52 | 0,0141 | 0,0047 | 0,0133 | 74,14 |

виключали похибку у визначенні оптичної густини, яка пов'язана з вимиванням із досліджуваних зразків не тільки піроксикаму, а й продуктів біодеградації полімерного носія.

Для утворення забарвлених продуктів взаємодії піроксикаму та алізарину, до 1 мл робочого розчину полімеру в ДМФА додавали 1 мл стокового розчину алізарину в ДМФА з концентрацією $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Отримані результати подані в табл. 1 і 2 та рис. 1.

Дослідження динаміки вивільнення НПЗП піроксикаму з сегментованих поліуретанових еластомерів при їх імплантації показало (рис.1), що для полімерної лікарської форми Л10(2)-5П на основі лактозвмісного еластомеру спостерігається двохступінчасте вивільнення піроксикаму з піками концентрацій на 3 і 30 добу дослідження. Найбільш інтенсивно піроксикам вивільняється із зразків на 3 добу перебування *in vivo*, що складає 54,4 % від загальної кількості іммобілізованого ППР. Кількість ППР, який вивільняється протягом 1 міс. імплантації Л10(2)-5П – 74,14 %. У разі імплантації Р16-5П основна маса піроксикаму вивільняється за 1 міс. перебування в умовах *in vivo*. Піроксикам виходить більш рівномірно, загальна кількість вивільненого препарату складає 43,41 %, що в 1,7 рази менше, ніж у попередньому разі. Найбільш інтенсивно лікарський препарат виходить із зразка на першу добу імплантації, що складає 37,04 % від загальної кількості іммобілізованого препарату.

Відомо [14], що на вивільнення лікарських препаратів з полімерних носіїв впливає хімічна природа

полімеру і лікарського препарату, їхні фізико-хімічні властивості, а саме гідрофільність, наявність іоногенних груп, здатність до координації та дисоціації, а також йонного обміну. Важливим фактором впливу на швидкість і тривалість вивільнення лікарського препарату є ступінь їх набрякання, яка напряму залежить від їх гідрофільності. В залежності від гідрофільності плівок і вмісту в них вологи змінюються умови дифузії, швидкість і відповідно, період вивільнення лікарської речовини з плівок та її подача в орган-мішень або навколишні тканини, як в нашому випадку, в необхідних дозах. Тобто, динаміка вивільнення лікарської речовини з полімерних лікарських форм залежить не тільки від природи іммобілізованого НПЗП, а й від природи полімерного носія. Наявність гідрофільної компоненти в складі сегментованих поліуретанових еластомерів 4,4'-дифенілметандіуретанлактози сприяє більш інтенсивному процесу вивільнення лікарської речовини *in vivo*.

Вивчення процесів судиноутворення в тканинах, які оточують полімерні лікарські форми з іммобілізованим інгібітором ангиогенезу на експериментальних тваринах

Протизапальну дію розроблених полімерних лікарських форм вивчали на прикладі зразків Р16-5П і Л10(2)-5П з іммобілізованим піроксикамом шляхом їх субкутальної імплантації експериментальним тваринам на термін 1, 3, 7, 14 і 30 днів і дослідження сполучнотканинної капсули, яка оточує імплантат, з використанням гістологічної методики. Як контроль були застосовані зразки того ж складу без піроксикаму (Р16, Л10(2)).

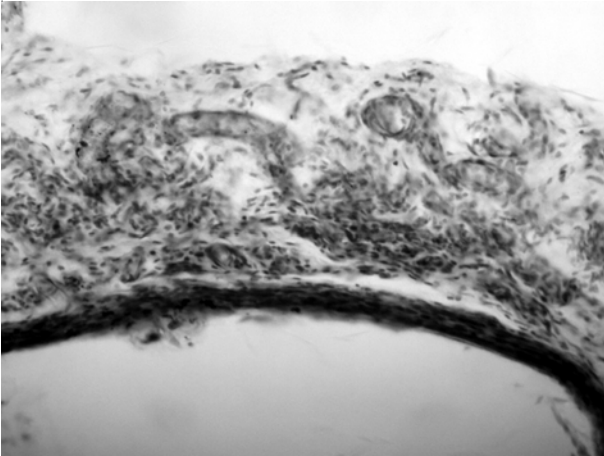


Рис. 2 Сполучнотканинна капсула навколо полімерного зразка Р16 через 1 міс. імплантації

Мікроскопічно на ранніх строках (1–3 доби) навколо контрольних зразків Р16 і Л10(2) спостерігались виражені альтернативні зміни у вигляді набряку, реакції мікроциркуляторного русла та виражених клітинних реакцій з перевагою клітин лейкоцитарного ряду. На 3-ю добу спостерігалася циркуляція лейкоцитів і поява макрофагальних і лімфоїдних елементів, а також незначна кількість гістоцитів і молодих фібробластичних елементів.

Через 2 тижні навколо контрольних зразків формується сполучнотканинна капсула різного ступеня зрілості з ділянками круглоклітинної інфільтрації та місцями слабковираженої судинної реакції. Аналогічна картина спостерігається через 1 міс. Відмічається тільки більш упорядковане розташування колагенових волокон щодо полімерного зразка та менш виражена круглоклітинна реакція (рис. 2).

Навколо полімерних зразків Р16-5П, які містять піроксикам, вже на 1-у добу разом з поліморфно ядерними лейкоцитами спостерігаються лімфоїдні елементи та крупні макрофаги, які можна бачити в перикапілярних просторах оточуючої сполучної тканини. Лімфоїдна реакція збільшується на 3-ю добу та починає замінюватись на репаративні процеси, про що свідчить поява епітеліодних клітин і молодих фібробластичних форм. Можна відмітити також менш виражені альтернативні зміни судинного русла (рис. 3) в порівнянні з контрольними зразками (рис. 4).

Через 2 тижні навколо полімерного зразка формується сполучнотканинна капсула різного ступеня зрілості, що підтверджується різною спрямованістю пучків колагенових волокон і різним ступенем зрілості клітин фібробластичного ряду. В оточуючій сполучній тканині, особливо в перикапілярних просторах, спостерігається слабо виражена лімфоїдна реакція, а також макрофаги та тучні клітини. Аналогічна картина з дещо більшим ступенем зрілості оточуючої сполучно-тканинної капсули спостерігається

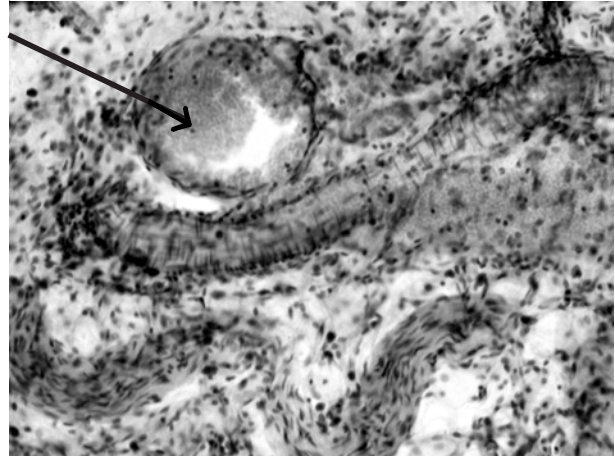


Рис. 3 Часткова альтерація (кровонаповнення судин) у навколишній тканині при імплантації зразків Р16-5П

через 1 міс. після імплантації.

Гістологічні дослідження лактозовмісних полімерних зразків з іммобілізованим піроксикамом Л10(2)-5П показали, що на 1-у добу дослідження клітинні реакції на імпантований матеріал не відрізняються від реакції на полімер Р16-5П, який не містить лактозовмісного фрагмента. На 3-ю добу явища альтерації навколо полімерного зразка Л10(2)-5П слабкі в порівнянні з контролем, також активно йдуть репаративні процеси, про які свідчить велика кількість молодих фібробластичних елементів у капсулі.

Через 2 тижні імплантації навколо полімерних зразків Л10(2)-5П формується однорідна сполучнотканинна капсула, яка складається з рядів фібробластичних елементів між рядами колагенових і ретикулінових волокон. До місячного строку капсула навколо зразків Л10(2)-5П має більш зрілу форму, однак лімфоїдних елементів у ній більше в порівнянні з капсулою, яка оточує зразки Р16-5П.

Таким чином, проведені гістологічні дослідження

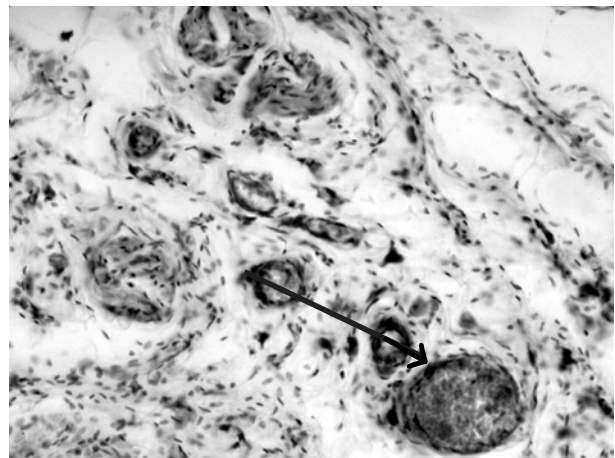


Рис. 4 Значна альтерація при контрольних імплантаціях

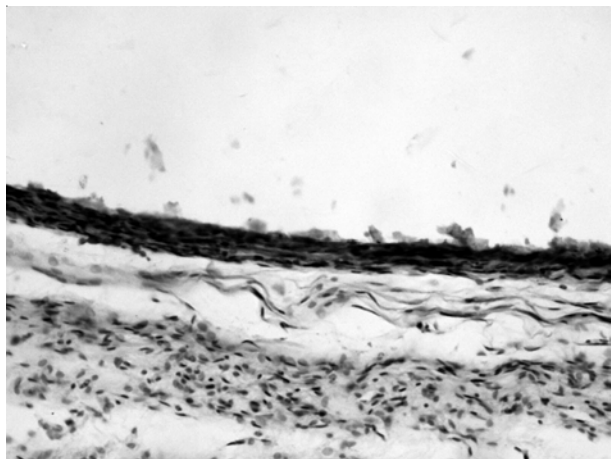


Рис. 5 Сполучнотканинна капсула навколо полімерного зразка з піроксикамом

при субкутальній імплантації зразків з піроксикамом показали, що на ранніх строках імплантації (1–3 доби) зменшується явище альтерації, викликане операційною

травмою (рис. 3). Має місце активація клітинних і тканинних процесів, які сприяють загоєнню. Спостерігається також стимуляція гуморального імунітету, що підтверджується більш раннім виходом лімфоїдних елементів (1 доба) в область імплантації та більш тривалою їх присутністю навколо імплантованих зразків. Вплив препарату на оточуючі тканини виражається в формуванні навколо імплантата більш щільної та тонкої капсули (рис. 5).

Гістологічні дослідження повністю корелюють з результатами динаміки вивільнення піроксикаму в організм експериментальних тварин, оскільки найбільша стимуляція гуморального імунітету припадає на 1 та 3 добу, що відповідає найбільш інтенсивному потраплянню піроксикаму в оточуючі тканини. Ефективна протизапальна дія полімерної лікарської форми, яка містить нестероїдний лікарський препарат, полягає в зменшенні запальних процесів при імплантації та місцевому інгібуванні процесів судиноутворення.

Література

1. Тюляндин С.А. Мишени лекарственной терапии будущего // Материалы третьей ежегодной Российской онкологической конференции. – Россия, Санкт-Петербург. – 1999. – С. 25–30.
2. Куприянов В.В., Миронов В.А., Миронов А.А., Гурина О.Ю. Ангиогенез: Образование, рост и развитие кровеносных сосудов. – М.: НИО «Квартет», 1993. – 206 с.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства.- 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Изд-во Новая Волна, 2005. – 1200 с.
4. Рожнова Р.А., Галатенко Н.А., Замуліна Л.І. // Доп. НАН України. – 2006. – № 8. – С. 177–181.
5. Рожнова Р.А., Галатенко Н.А., Замуліна Л.І., Гладир І.І. // Полімерна технологія. – 2005. – № 5. – С. 96–100.
6. European Pharmacopoeia. – 2002. – N 4. – P. 1771.
7. Arancibia J.A., Escandar G.M. // Talanta. – 60, N 6. – 2003. – P. 1113–1121.
8. Jager A.D., Ellis H., Hundt H.K.L. // J. of Chromatography. – 729, N 6. – 1999. – P. 183–189.
9. Alaa S. Amin. // J. of Pharmaceutical and biomedical analysis. – 2002. – 29. – P. 729–726.
10. Галатенко Н.А., Рожнова Р.А., Замуліна Л.І. // Доп. НАН України. – 2007. – № 9. – С. 125–130.
11. Нечаєва Л.Ю., Галатенко Н.А., Буфисус Н.Н. // Фармація. – N 2. – 1989. – С. 24–27.
12. Grigorieva M., Gladir I., Galatenko N. // J. of Bioactive and Compatible Polymers. – 2001. – 16. – P. 161–168.
13. Насыбуллина Н.М., Алексеев К.В., Астраханова М.М. // Фармація. – 1997. – № 5. – С. 15–16.
14. Шальнова Л.И., Николаев А.Ф. // Пласт. массы. – № 3. – 2000. – С. 42–45.

Надійшла до редакції 7 березня 2008 р.

Исследование эффективности полимерных лекарственных форм НПЗП на основе сегментированных полиуретановых эластомеров *in vivo*

Р.А. Рожнова, Н.А. Галатенко, Е.С. Савицкая, Л.Ю. Нечаева, Е.Г. Левенец

Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины
48, Харьковское шоссе, Киев, 02160, Украина

Установлено, что эффективное действие полимерных лекарственных форм, содержащих пироксикам, состоит в уменьшении воспалительных процессов при имплантации и местном ингибировании процессов сосудобразования. Наибольшая стимуляция гуморального иммунитета наблюдается на 1 и 3 сутки имплантации, что соответствует наиболее интенсивному попаданию пироксикама в окружающие ткани.

Investigation of effectiveness of polymeric drug forms NSAID on bases of segmented polyurethane elastomers *in vivo*

R.A. Rozhnova, N.A. Galatenko, O.S Savitslkaya, L.Yu. Nechaeva, Ye.G. Levenec

Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine
48, Kharkivske shausse, Kyiv, 02160, Ukraine

It was established, that affective action of polymeric drug forms containing the piroxicam consist in decrease of inflammation processes at implantation and local inhibition of vascularization processes. The most stimulation humoral immunity at 1 and 3 days of impantation, that corresponds to the most intensive hit of piroxicam in surrounding tissues.