

УДК 517.17

ЕСТЕРИ БАГАТОАТОМНИХ СПИРТІВ — ПОТЕНЦІЙНІ ПІДСИЛЮВАЧІ КРІЗЬШКІРНОЇ ПРОНИКНОСТІ ФЕНАЗЕПАМУ

¹Бойко Ю.О., ^{1,2}Кравченко І.А., ²Новікова Н.С.

¹Одеський національний університет ім. І.І.Мечникова,
кафедра фармацевтичної хімії

²Фізико-хімічний інститут ім. О.В.Богатського НАН України

Ключові слова: естери, трансдермальний, ліпосоми.

Вступ

Розробка нових підсилювачів трансдермальної проникності та зв'язування механізмів їх дії є актуальною задачею при створенні трансдермальних лікарських форм та дослідження трансдермального способу введення лікарських препаратів.

Найбільш суттєвою перешкодою на шляху проникнення лікарських препаратів крізь шкіру є роговий шар епідермісу [1, 2, 3, 4]. Головним завданням підсилювачів проникності є вплив на фізико-хімічні властивості компонентів рогового шару, який би дозволив сприяти надходженню лікарських речовин до васкуляризованих шарів шкіри. Основу рогового шару складають корнеоцити, які оточені інтерцелюлярним матриксом [5, 6]. Однією з можливостей підвищити проникність рогового шару є підвищення плинності інтерцелюлярного матриксу [7, 8]. Це може бути досягнуто шляхом включення до ліпідних шарів різних хімічних речовин, молекули яких сприяють дестабілізації упорядкованої мембранної структури [9, 10, 11]. Прикладом таких речовин можуть бути спирти [12, 13, 14] та карбонові кислоти [13, 15, 16]. Виходячи з цього, у якості підсилювачів крізьшкірної проникності нами були обрані естери багатоатомних спиртів та насичених карбонових кислот.

У якості фармацевтичного агенту нами було обрано похідне 1,4-бенздіазепіну, зокрема, феназепам. Цей вибір було обумовлено декількома факторами: молекула феназепаму невелика та ліпофільна, здатна достатньо легко долати крізьшкірний бар'єр. Крім того, феназепам відноситься до препаратів, концент-

рація яких повинна підтримуватися на постійному рівні в організмі протягом тривалого часу, саме тому розробка трансдермальних терапевтичних систем на його основі є важливою і актуальною задачею.

Матеріали та методи

Як активну сполуку в досліджах *in vivo* та *in vitro* використовували 7-бром-5(2'-хлор)феніл-1,2-дігідро-3Н-1,4-бензодіазепін-2-он (феназепам), який був синтезований у відділі медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім.О.В.Богатського НАН України, для досліджень *in vitro* було використано феназепам, який був мічений ¹⁴С у другому положенні.

У всіх дослідженнях використовували підсилювачі крізьшкірної проникності – 1,2-пропандіол-1-пеларгонат, 1,2-пропандіолділаурат, гліцерил-1-пеларгонат. Усі естери були синтезовані в відділі молекулярної структури Фізико-хімічного інституту ім.О.В.Богатського НАН України.

Для дослідження проникності шкіри *in vivo* використовувалися білі безпородні миші обох статей, вагою 18-22 г, що утримувалися в стандартних умовах віварію, з вільним доступом до їжі та води.

Трансдермальні терапевтичні системи (ТТС) виготовляли за наступною методикою: воду, полівініловий спирт, гліцерин, ПЕО-400 та 1,2-пропіленгліколь (передчасно розчинив у ньому активну речовину) змішували у пропорції 4:2:1:1:2. До отриманої рідкої матриці додавали один з естерів у кількості 10 % від маси матриці та ретельно перемішували.

вали. Отриману ТТС заливали у спеціальну форму та залишали висихати до постійної маси. Концентрація похідного 1,4-бенздіазепіну у готовій системі складала 0,4 мг/см².

Аплікування ТТС проводилось на передчасно вистрижену міжлопаткову ділянку. Час аплікації - 2 год. Розмір аплікованої ТТС – 1 см². Оцінку кількості речовини, яка проникла, здійснювали визначенням мінімальних ефективних доз (МЕД) 1 % розчину коразолу, які викликали клоніко-тонічні судоми (КТС) та тонічну екстензію (ТЕ) при його введенні до хвостової вени експериментальним тваринам. Переваги цього методу перед іншими способами визначення протисудомної активності у тому, що він є концентраційно залежним та швидкозворотнім, що дозволяє коректно оцінювати ступінь надходження протисудомної речовини до організму експериментальних тварин.

Для дослідження проникності феназепаму *in vitro* використовували роговий шар епідермісу молодих щурів-самців. Відокремлення рогового шару епідермісу проводилось за допомогою витримання шкіри в 1,5 % розчині трипсину (250 Е/мг) протягом 24 годин при температурі 4 °С, з послідовним термостатуванням при 37 °С протягом 3 годин, далі роговий шар механічно відокремлювали від нижче лежачих шарів, промивали та висушували при кімнатній температурі.

Використовували ТТС слідуючого складу: вода, полівініловий спирт, гліцерин, ПЕО-400 та 1,2-пропіленгліколь у співвідношенні 4:2:1:1:2. Кількість феназепаму складала 1,7 мг на 1 г ТТС, кількість вводимого підсилювача проникності – 10 % від маси ТТС.

Отриманий епідерміс закріплювали в комірках Франса, після чого на нього наносили ТТС та витримували протягом 1, 2, 3, 6, 18, 24 годин. Кількість речовини, що проникла визначали методом рідинної сцинтиляційної фотометрії.

Ліпіди рогового шару шкіри отримували з передчасно відпрепарованого ро-

гового шару шкіри, за класичною методикою Блая-Дейра. Роговий шар заливали системою хлороформ-метанол-вода (1:2:0,8). Екстракт розводили одним об'ємом води та хлороформу. З утвореної двофазної системи відділяли хлороформний шар, випаровували на роторному випарювачі, залишок розчиняли в зневодненому чотирьоххлористому вуглецю.

Плинність мембран вимірювали флуорометричним методом на спектрофлуориметрі «Varian Carry Eclipse» по зміні інтенсивності флуоресценції пірену в лецитинових ліпосомах або ліпосомах з ліпідів рогового шару. Ліпосоми готували слідуючим чином: пірен, підсилювач проникності, лецитин (ліпіди рогового шару) у молярному відношенні 1:10:100 розчиняли у хлороформі, після чого хлороформ відганяли на роторному випарювачі. До сухого залишку додавали воду та інтенсивно збовтували протягом 10 хвилин до утворення емульсії. Отриману емульсію оброблювали ультразвуком протягом 10 хвилин, при частоті 22 кГц. Концентрація ліпосом в досліджуваних розчинах складала 0,8 г/л.

Зняття ІЧ-спектрів зразків епідерміса проводили в 2 етапи. Перший етап включав зняття спектрів необроблених зразків. На другому етапі на зразки епідермісу наносили ТТС, яка містила один з підсилювачів проникності, після чого витримували добу при 37 °С, видаляли ТТС та проводили повторне зняття спектрів. Спектри знімали на ІЧ-спектрометрі «FTIR-8400S» фірми «Shimadzu», діапазон вимірювань від 4000 см⁻¹ до 400 см⁻¹.

Результати та обговорення

Як вже було сказано вище, головним бар'єром при трансдермальном введенні лікарських речовин є роговий шар епідермісу. Вивчення зміни властивостей, щодо проникності рогового шару під впливом підсилювачів, які було введено до складу ТТС, вивчалось за допомогою трансдермальних комірок Франса (рис. 1).

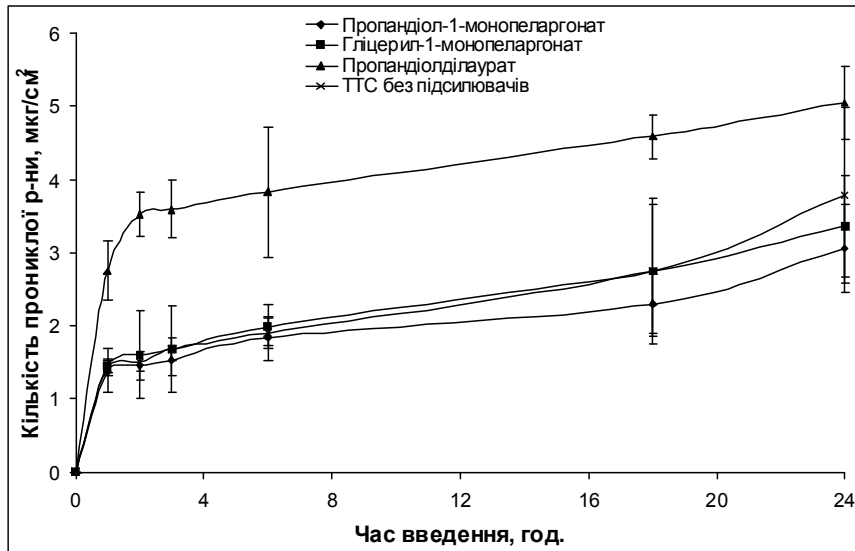


Рис. 1. Вплив естерів багатоатомних спиртів у складі ТТС на проникність ¹⁴C-феназепаму крізь роговий шар епідермісу

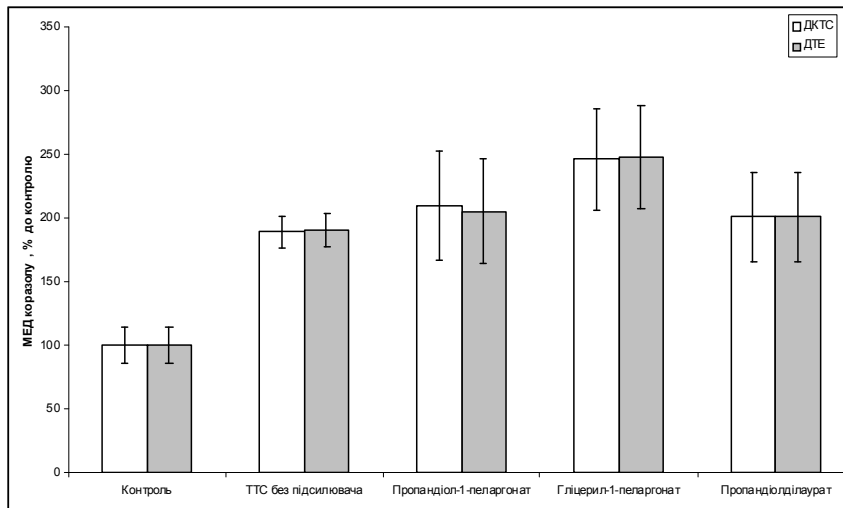


Рис. 2. Вплив естерів багатоатомних спиртів у складі ТТС на крізьшкірну проникність феназепаму *in vivo*

Було показано, що пропандіол-1-монопеларгонат та гліцерил-1-монопеларгонат практично не оказують впливу на проникність феназепаму крізь роговий шар (кількість прониклого феназепаму при використанні цих підсилювачів коливається на рівні контрольних значень – ТТС без підсилювачів). Пропандіолділаурат підвищує проникність в 1,3-2,3 рази, залежно від часу введення. Лаг-час був однаковим для ТТС з усіма підсилювачами і складав 2 години. Різницю між використаними підсилювачами можливо пояснити наявністю двох ацильних залишків в молекулі більш активного пропандіолд-

ілаурата. Літературні данні вказують, що є декілька шляхів впливу спиртово-кислотних естерів на роговий шар [17, 18]. Головний з них – безпосередня взаємодія естерів з ліпідним матриксом. Надходячи до ліпідних шарів, естери викликають зміни фізичних властивостей, що призводить до посилення проникності. Менша гідрофільна головка та наявність двох кислотних залишків, дозволяє лауриново-му дієстеру легше переміщуватись між ліпідними шарами сприяючи порушенню їх упорядкування. Для моноестерів такий ефект менш виражен.

Подальше вивчення естерів в умовах *in vivo* дозволяє оцінити їх ефективність при наявності ферментатив-

них систем. Взаємодія останніх з естерами призводить до гідролітичного розщеплення естерів з вивільненням спиртів та кислот. Дані щодо проникнення феназепаму в умовах *in vivo* представлені на рис. 2.

На відміну від результатів отриманих *in vitro*, у даному випадку найбільший вплив на проникність феназепаму оказував гліцерил-1-пеларгонат (в 2,5 рази більше контрольних значень та 1,25 рази більше значень ДКТС і ДТЕ при використанні ТТС без підсилювача). Естери пропандіолу оказували менший ефект (приблизно у двічі більше контрольних зна-

чень). Якщо в умовах *in vitro* головним фактором була кількість ацильних залишків, то в умовах *in vivo*, при наявності ферментативного гідролізу, більш велике значення має кількість гідроксильних груп в спиртовій молекулі. Можливо припустити, що гліцерин, знаходячись на поверхні ліпідного шару, займає положення більш рухливе та нестабільне, ніж пропандіол. Це призводить до ефекту більшого розупорядкування в ліпідних шарах і більше підсилює кризьшкірну проникність.

Вивчення механізму впливу складних естерів на роговий шар епідермісу та його ліпідні структури є важливим кроком в розумінні дії цих речовин, як підсилувачів кризьшкірної проникності. Одним з методів вивчення механізмів впливу речовин-підсилувачів на роговий шар є метод ІЧ-спектроскопії. Завдяки змінам в смугах поглинання тих чи інших хімічних груп, можливо зробити висновки о їх рухливості, конформаційних перебудовах, міжмолекулярних зв'язках [19,20,21]. Результати досліджень ІЧ-спектрів пропускання оброблених та необроблених зразків рогового шару наведені в табл. 1.

При вивченні ІЧ-спектрів пропускання зразків обробленого та необробленого рогового шару епідермісу, можливо дістатися висновку, що усі досліджені естери впливали на молекулярні структури ліпідних шарів. Для пропандіолу-1-пеларгонату спостерігався зсув у бік більших хвильових чисел смуг 2848 та 2916 cm^{-1} (з 2848 до 2850 cm^{-1} та з 2916 до 2918 cm^{-1}), які є характерними для вуглеводневих груп ліпідів. Подібний зсув, є показником підвищення рухливості цих груп. Крім зсуву максимуму поглинання,

спостерігалось збільшення площин під пиками (в 1,8 рази для смуги 2916 cm^{-1}), що в свою чергу свідчить о збільшенні кількості рухливих груп. Подібні зсуви спостерігались і для гліцерил-1-пеларгонату (з 2848 до 2852 cm^{-1} та з 2915 до 2921 cm^{-1}), але площини під пиками практично не змінювалися. Пропандіолділаурат оказував вплив подібний до гліцерил-1-пеларгонату – не змінював площу під пиками, але максимумами поглинань зсувалися у бік більших хвильових чисел.

Крім зміни вуглеводневих груп інтерес являють водневі зв'язки гідроксильних груп. Як і для максимумів поглинань вуглеводневих, так і для максимумів поглинань водневих зв'язків, спостерігався зсув у бік більших хвильових чисел при використанні естерів у якості підсилувачів. Найбільший зсув спостерігався при використанні гліцерил-1-пеларгоната, з 3278 cm^{-1} до 3290 cm^{-1} . Площини під пиками значно не змінювалися.

Одним з можливих механізмів впливу естерів багатоатомних спиртів на ліпідні шари є підвищення їх плинності, яке досягається завдяки розупорядкуванню правильної укладки молекул ліпідів у шарі. Дослідити цей процес можливо за зміною інтенсивності флюоресценції мембранного зонду, який поміщено до ліпідного бішару [22]. В якості ліпідних бішарів нами були використані ліпосоми, які були отримані з лецитину та ліпосоми, що були отримані з ліпідів рогового шару. Дані щодо змін інтенсивності флюоресценції пірену (мембранний зонд) [23] в лецитинових ліпосомах наведені на рис.3.

Естери пропандіолділаурат та гліцерил-1-монопеларгонат знижували інтенсивність флюоресценції (у 1,5-2 рази), та як наслідок, підвищували плинність. На відміну від них, пропандіол-1-пеларгонат не оказував вираженої дії на інтен-

Таблиця 1

Максимума поглинань та площини під пиками в ІЧ-спектрах зразків рогового шару, до та після обробки естерами багатоатомних спиртів та карбонових кислот

Тип зв'язку	Пропандіол-1-пеларгонат				Гліцерил-1-пеларгонат				Пропандіолділаурат			
	До		Після		До		Після		До		Після	
	1/ λ_1 cm^{-1}	S під піком	1/ λ_1 cm^{-1}	S під піком	1/ λ_1 cm^{-1}	S під піком	1/ λ_1 cm^{-1}	S під піком	1/ λ_1 cm^{-1}	S під піком	1/ λ_1 cm^{-1}	S під піком
-CH ₂	2848	597	2850	646	2848	646	2852	678	2848	459	2852	446
	2916	120	2918	219	2918	135	2921	154	2916	98	2921	118
	2952	78			2954	87						
O-H	3284	901	3286	901	3278	991	3290	994	3284	740	3286	720

сивність флюоресценції (у 1,5-2 рази), та як наслідок, підвищували плинність. На відміну від них, пропандіол-1-пеларгонат не оказував вираженої дії на інтен-

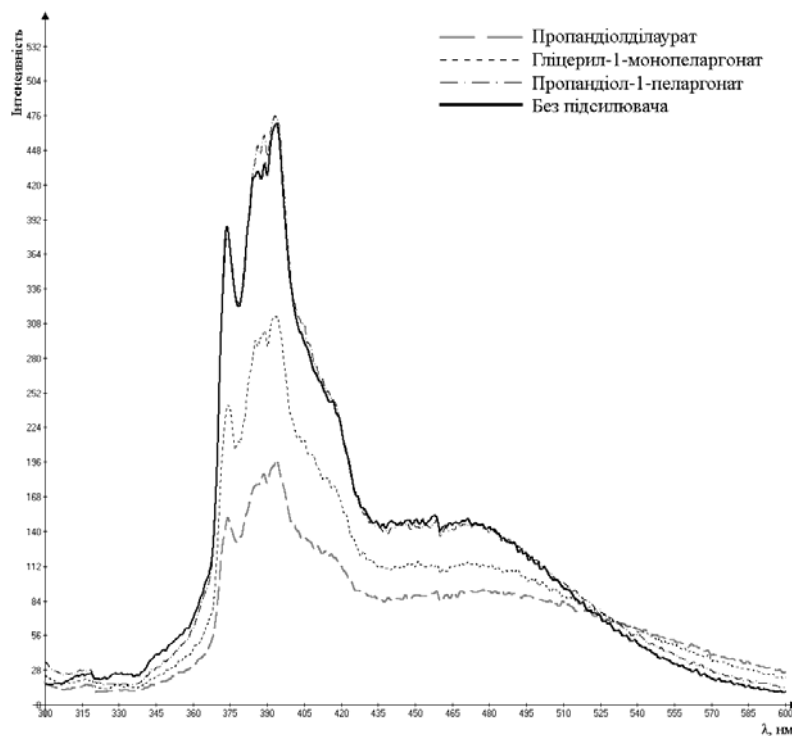


Рис. 3. Залежність інтенсивності флюоресценції пірену від зміни плинності фосфоліпідного бішару ліпосом при додаванні естерів багатоатомних спиртів

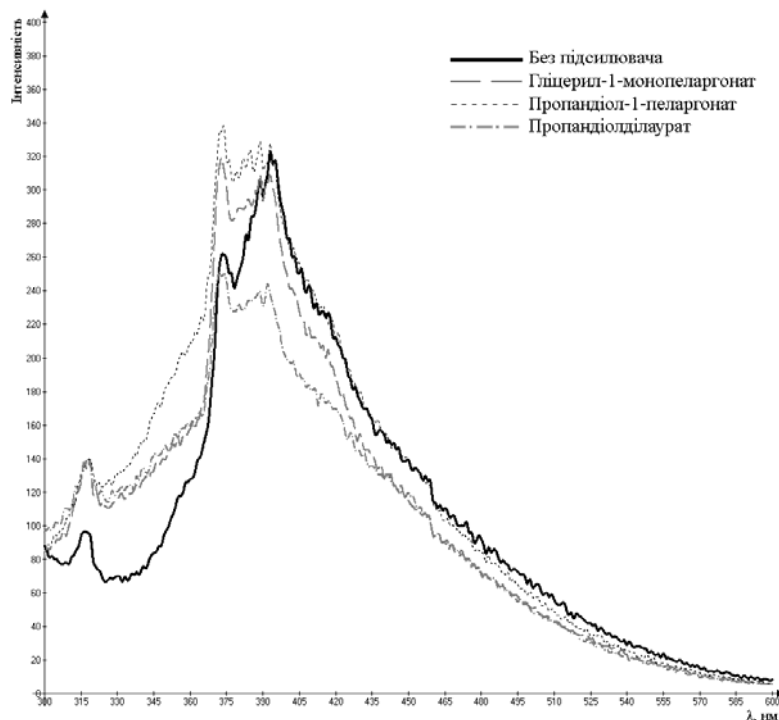


Рис. 4. Залежність інтенсивності флюоресценції пірену від зміни плинності керамідного бішару ліпосом при додаванні естерів багатоатомних спиртів

сивність флюоресценції пірену. З отриманих даних можливо дійти висновку, що основний дестабілізуючий вклад дають

підсилювачів трансдермальної проникності феназепаму. Різницю між показниками *in vitro* та *in vivo*, яку ми спостеріга-

кислотні залишки. Крім того, важливим є наявність або відсутність гідроксильних груп, що формують гідрофільну головку та дозволяють закріпитися естерам у товщі ліпідного бішару. Пропандіолділаурат, що не має подібної головки (усі гідроксильні групи етерифіковані) не має закріпленого положення у бішарі та в більшому ступені ніж інші розглянуті естери підвищує плинність.

Дані щодо впливу естерів багатоатомних спиртів на плинність ліпосом, які отримані з ліпідів рогового шару наведені на рис. 4.

На відміну від ліпосом, які були отримані з фосфоліпідів, при включенні естерів багатоатомних спиртів до ліпосом, які були отримані з ліпідів рогового шару, інтенсивність флюоресценції пірену змінюється не значно, порівняно з контрольними значеннями (крім пропандіолділаурату). У той же час спостерігався зсув максимуму флуоресценції у бік меншої довжини хвилі. Подібний зсув є характерною ознакою зменшення полярності мембранного оточення.

Ці дані хорошо корелюють з даними, які були отримані в дослідях *in vivo*.

Заключення

Дані, що були отримані в дослідях *in vitro* та *in vivo*, показали ефективність використання естерів багатоатомних спиртів у якості

ли, можливо пояснити наявністю ферментативного гідролізу в епідермісі живої тварини. При дослідженні можливих механізмів дії естерів на роговий шар епідермісу, нами було зафіксовано їх вплив на рухливість вуглеводневого скелету ліпідів, а також вплив на водневі зв'язки в роговому шарі. Було показано підвищення плинності ліпідного бішару на прикладі фосфоліпідних ліпосом.

Література

1. Proksch E., Brandner J.M., Jensen J.-M.. The skin: an indisperable barrier // *Exp.Dermatology*, 2008, Vol.17, P.1063-1072
2. Feingold K.. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis // *J. Lipid Res.*, 2007 Vol.48, P.2531-2546
3. Ackermann K., Lombardi Borgia S., Korting H.C., Mewes K.R., Schafer-Korting M.. The phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing // *Skin Pharm. And Physiol.*, 2010, Vol.23, P.105-112
4. Prausnitz M.R., Langer R.. Transdermal drug delivery // *Nat Biotechnol.*, 2008, Vol.26, №11, P.1261-1268
5. Swartzendruber D.C., Wertz P.W., Kitko D.J., Madison K.C., Downing D.T. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum (1989) *Journal of Investigative Dermatology*, Vol.92, №2, P. 251-257.
6. Белоусова Т.А., Горячкина М.В. Современные представления о структуре и функции кожного барьера и терапевтические возможности коррекции его нарушений // *Русский Медицинский Журнал*. – 2004. – Том 12, №18. – Стр. 1082-1085
7. Кравченко И.А. Трансдермальное введение лекарственных препаратов. – Одесса: «Астропринт», 2001. – 168 стр.
8. Кравченко И.А., Андронати А.С., Ларионов В.Б.. Физико-химические основы усиления трансдермального введения лекарственных препаратов. – Одесса: «Астропринт», 2002. – 224 стр.
9. Sinha V. R., Kaur Maninder Pal. Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery // *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2000, Vol. 26, No. 11, Pages 1131-1140
10. Subedi R.K., Oh S.Y., Chun M.K., Choi H.K.. Recent advances in transdermal drug delivery // *Arch Pharm Res*. 2010 Mar;33(3):339-51.
11. Massimiliano Nino, Gabriella Calabrt, Pietro Santoianni. Topical delivery of active principles: The field of dermatological research // *Dermatology Online Journal*, 2010, Vol.16, № 1, P.4.
12. Goates C.Y., Knutson K.. Enhanced permeation of polar compounds through human epidermis. I. Permeability and membrane structural changes in the presence of short chain alcohols // *Biochim Biophys Acta*. 1994 Oct 12;1195(1):169-79.
13. Gannu R., Vishnu Y.V., Kishan V., Rao Y.M.. In vitro permeation of carvedilol through porcine skin: effect of vehicles and penetration enhancers / *PDA J Pharm Sci Technol*. 2008 Jul-Aug;62(4):256-63.
14. Kanikkannan N., Singh M.. Skin permeation enhancement effect and skin irritation of saturated fatty alcohols // *Int J Pharm*. 2002 Nov 6;248(1-2):219-28.
15. Nanayakkara G.N., Bartlett N., Forbes B., Marriott C., Whitfield P.J., Brown M.B.. The effect of unsaturated fatty acids in benzyl alcohol on the percutaneous permeation of three model penetrants // *Int. J. Pharm.*, 2005, Vol. 301, № 1-2, P. 129-139.
16. Niazy E.M.. Influence of oleic acids and other permeation promoters on

- transdermal delivery of dihydroergotamine through rabbit skin / / Int. J. Pharm., 1991, Vol. 67, P. 97.
17. Yamamoto K., Takahashi Yu., Akiyama H., Tsuji K., Onishi H., Machida Y. Effect of penetration enhancers on transdermal delivery of propofol // Biol. Pharm. Bull., 2009, Vol. 32, № 4, P. 677-683.
 18. Seki T., Morimoto K.. Enhancing effects of medium chain aliphatic alcohols and esters on the permeation of 6-carboxyfluorescein and indomethacin through rat skin // Drug Deliv., 2003, Vol. 10, № 4, P. 289-293.
 19. Vaddi H.K., Ho Paul Chi-Lui, Chan Yew Weng, Chan Sui Yung. Oxide terpenes as human skin penetration enhancers of haloperidol from ethanol and propylene glycol and their modes of action on stratum corneum // Biol. Pharm. Bull. 2003. Vol.26, №2, P.220-228
 20. Brancalion L., Bamberg M.P., Sakamaki T., Kollias N.. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy as a possible method to investigate biophysical parameters of stratum corneum *in vivo* // J. Inv. Dermat. 2001. Vol.3. №3. P.380-386
 21. Gooris G.S., Bouwstra J.A.. Infrared Spectroscopic Study of Stratum Corneum Model Membranes Prepared from Human Ceramides, Cholesterol, and Fatty Acids // Biophys. J.. 2007. Vol.92. №8. P.2785-2795
 22. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: изд. «Наука», 1980, 320 с.
 23. Shrivastava S., Paila Y.D., Dutta A., Chattopadhyay A.. Differential effects of cholesterol and its immediate biosynthetic precursors on membrane organization. // Biochemistry. 2008 Vol. 47, №20, P. 5668-5677.

Резюме

ЭФИРЫ МНОГОАТОМНЫХ СПИРТОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ УСИЛИТЕЛИ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ФЕНАЗЕПАМА

Бойко Ю.А., Кравченко И.А., Новикова Н.С.

Было изучено влияние эфиров многоатомных спиртов на трансдермальную проницаемость кожи для феназепама *in vivo*. Изменения в подвижности и конформации липидных молекул рогового слоя было изучено с помощью метода ИК-спектроскопии. Молекулярные механизмы текучести липосом, полученных из фосфолипидов и липидов рогового слоя, были изучены с помощью флуоресцентной спектроскопии. Нашими исследованиями показана эффективность использования сложных эфиров многоатомных спиртов в качестве усилителей чрезкожной проницаемости.

Ключевые слова: эфиры, трансдермальный, липосомы

Summary

ESTERS OF POLYATOMIC ALCOHOLS IS THE POTENTIAL ENHANCERS OF PHENAZEPAM TRANSDERMAL DELIVERY

Boiko Yu.A., Kravchenko I.A., Novikova N.S.

Was studied the effect of polyatomic alcohols esters on the permeation of phenazepam from transdermal delivery system across skin *in vivo*. Changes in the amount and conformation of stratum corneum lipids were determined by Fourier transform infrared spectroscopy. Molecular-level mechanisms of fluidity of large unilamellar phospholipids and lipids of stratum corneum vesicles were investigated by fluorescence spectroscopy. Our findings demonstrate that esters of polyatomic alcohols can be the effective enhancer of transdermal delivery.

Key words: esters, transdermal, liposomes.

*Впервые поступила в редакцию 30.05.2010 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*