

ФАРМАКОКІНЕТИКА ГЛЮКОЗАМІНІЛ-МУРАМІЛДИПЕПТИДУ В ЛІПОСОМАХ ПРИ ВНУТРІШНЬОВЕННОМУ ВВЕДЕННІ МИШАМ

Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ

Відома здатність мурамілпептидів (мурамоїлпептидів) активувати систему вродженого імунітету за участі механізму розпізнавання молекулярних обрисів патогена, що забезпечує імуномодуляцію за наявності відповідних рецепторів у імунних клітинах (моноцитах, макрофагах, лімфоцитах та ін.). Мурамілдипептид (МДП) і глюкозамініл-мурамілдипептид (ГМДП) є мінімальними активними фрагментами пептидогліканів бактеріальної стінки й агоністами рецепторів (NOD2, NALPs), які проявляють сигнальну дію у вигляді праймінгу та синергізму з іншими стимулами й ад'ювантну дію при стимуляції неспецифічної імунорезистентності. Посилення продукції цитокінів й ефекторних функцій клітин імунної системи ініціює швидку генералізовану реакцію організму на протидію патогенному вторгненню або інвазії пухлин [1].

Внаслідок значного поступу в дослідження специфічної активності синтетичні мурамілпептиди входять до складу сучасних лікарських засобів, призначених для ад'ювантної імунотерапії та профілактики розповсюдження інфекційних й онкологічних захворювань [2]. Важливою передумовою для реалізації фармакологічної дії мурамілпептидів вважають пролонгацію їх знаходження в циркуляції та підвищення біодоступності на противагу швидкій екскреції й інактивації. Ліпосоми із природних фосфоліпідів як транспортна форма для мурамілпептидів відповідають цим умовам [3] і, насамперед,

забезпечують належний доступ до фагоцитуючих клітин моноцитарно-макрофагальної системи. Як свідчать попередні дослідження, ГМДП у ліпосомальній формі, на противагу вільному пептиду, викликає активацію макрофагів і пригнічує метастазування експериментальних пухлин у мишей [4; 5].

Метою цієї роботи було порівняльне вивчення фармакокінетики ГМДП у вільному стані і в складі фосфатидилхолінових ліпосом різного розміру при внутрішньовенному введенні здоровим мишам.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на мишах-самцях масою 18–20 г лінії С57BL/6. Тварин утримували у стандартних умовах. Мишей поділили на три групи: першій групі одноразово вводили в ретроорбітальний венозний синус вільний ГМДП у фізіологічному розчині (0,9 % NaCl), другій групі — пептид у ліпосомах малого розміру (одношарові ліпосоми до 100 нм); третій групі — пептид у ліпосомах великого розміру (багатошарові ліпосоми до 800 нм). Через 5 хв і 0,5; 1; 2; 3; 6 год після введення тварин декапітували під легким ефірним наркозом, дотримуючись положень «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Приготування ліпосом із яєчного фосфатидилхоліну (ЯФХ) і завантаження їх пептидом (ліпід / пептид, 100:1 за вагою) проводили методом гідратації

та спонтанної везикуляції тонких ліпідних плівок у фізіологічному розчині. Ліпосоми малого розміру отримували методом обробки ультразвуком (5 хв, Fisher M 300, США), а ліпосоми великого розміру — методом заморожування-розморожування [6].

Для спостереження за фармакокінетикою у крові та розподілом в органах використовували радіоактивну похідну пептиду, синтезовану за методом [7]. ГМДП-¹²⁵I додавали до нерадіоактивного пептиду для відтворення загальної дози (50 мкг/кг, (5–10) · 10⁶ імп/(хв·кг)). Радіоактивність зразків біологічних тканин вимірювали в γ-лічильнику (Beckman, США). Фармакокінетичні параметри визначали в межах двочастинної моделі та модельно-незалежним методом за допомогою комп'ютерної програми FarmKin Pro (ЦНІТ Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, Вінниця).

У роботі використовували ЯФХ (ЗАТ «Біолек», Харків), синтетичний ГМДП і похідні для виготовлення ГМДП-¹²⁵I були надані Т. М. Андроновою (Інститут біоорганічної хімії ім. М. М. Шемякіна і Ю. А. Овчиннікова РАН, Москва).

Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою комп'ютерної програми Origin 6.1 і MS Excel.

Результати дослідження та їх обговорення

Динаміку зміни концентрацій вільного та ліпосомального ГМДП, що розраховані на основі визначеної дози (50 мкг/кг)



і вмісту радіоактивної речовини (ГМДП-¹²⁵I), досліджували у зразках крові 5–8 тварин на кожному інтервалі часу. Значні відмінності між концентраціями вільного та ліпосомального пептиду спостерігалися протягом усього експерименту. Найбільший вміст радіоактивної речовини було зафіксовано в інтервалі 60 хв після введення ГМДП-¹²⁵I в маленьких ліпосомах порівняно з вільним пептидом і у великих ліпосомах. Надальі концентрації пептиду в ліпосомах обох типів збігалися, проте більше ніж у 10 разів переважали рівень вільного пептиду до кінця терміну спостереження.

Фармакокінетичні параметри, розраховані за допомогою програми FarmaKin Pro для усіх форм пептиду, подано у табл. 1. У вільному стані пептид швидко виводився з організму, про що свідчать короткі терміни напіврозподілу ($t_{1/2\alpha}$, 9,7 хв) і напіввиведення ($t_{1/2\beta}$, 54,5 хв). Об'єм розподілу в центральній камері (V_c , 11 мл) і стаціонарний об'єм розподілу (V_{ss} , 21,4 мл) суттєво перевищують об'єм крові миші та вказують на здатність пептиду чи метаболітів виходити (у периферійну камеру) та потрапляти в кров, можливо, внаслідок всмоктування (зворотного захоплення) та реабсорбції [8].

Включення в ліпосоми із ЯФХ принципово змінювало фармакокінетику ГМДП-¹²⁵I у крові. У разі введення пептиду в маленьких і великих ліпосомах спостерігалася виразне зростання термінів напіврозподілу ($t_{1/2\alpha}$, 27,5 і 36,2 хв) і напіввиведення ($t_{1/2\beta}$, 520,7 та 420,0 хв) та зниження констант швидкості переходу (мікроконстант, K_{12} , K_{21} , K_{el}) двочастинної моделі. Об'єм розподілу в центральній камері (V_c , 5,4 та 7,5 мл) і стаціонарний об'єм розподілу (V_{ss} , 18,0 і 20,7 мл) пептиду в ліпосомах перевищували об'єм крові миші, проте були меншими, ніж для вільного пептиду. Важливою відзнакою фармакокіне-

Таблиця 1
Параметри фармакокінетики ГМДП-¹²⁵I вільного і в ліпосомах із ЯФХ

Параметри	ГМДП у вільному стані	ГМДП у ліпосомах малого розміру	ГМДП у ліпосомах великого розміру
$t_{1/2\alpha}$, хв	9,7	27,5	36,2
$t_{1/2\beta}$, хв	54,5	520,7	420,0
$K_{1,2}$, хв ⁻¹	0,021	0,015	0,01
K_{el} , хв ⁻¹	0,041	0,005	0,006
$K_{2,1}$, хв ⁻¹	0,022	0,006	0,005
V_c , мл	11,0	5,4	7,5
V_{ss} , мл	21,4	18,0	20,7
CL, мл/хв	0,446	0,028	0,043
AUC, мкг·хв/мл	2,2	35,1	23,0
MRT, хв	48,0	632,8	475,3

тики пептиду у ліпосомальній формі було зростання рівня відносної біодоступності, що підтверджено змінами немодельних параметрів: зниження загального кліренсу крові (CL); збільшення у 10–15 разів площі під фармакокінетичною кривою (AUC); зростання середнього часу утримання (MRT).

Результати дослідження розподілу вільного пептиду по органах мишей (процент від введеної дози, розрахований на масу органа) наведені у табл. 2. Так, на 5-й хвилині після введення вміст ГМДП-¹²⁵I у крові був у 2,5 рази меншим ((12,6±2,4) % дози), ніж у нирках ((26,2±3,4) % дози) та кишечника ((6,2±0,7) % дози) разом. Через 60 хв вміст радіоактивної речовини у крові знижувався в 10 разів — (0,9±0,6) % дози, проте досягав найбільшого рівня в кишечнику — (11,8±0,5) % дози. Кінетика розподілу радіоактивної речовини у тканинах вказує на можливість швидкого виведення вільного пептиду через нирки та печінку (жовч). Короткочасне знаходження вільного пептиду в циркуляції не супроводжується нагромадженням мітки в органах (печінка, селе-

зінка, легені та ін.), що є мішенями для дії імуноотропного препарату.

В експериментах, коли мишам вводили ГМДП-¹²⁵I в маленьких і великих ліпосомах із ЯФХ (табл. 3), вже на 5-й хвилині спостерігалася затримка радіоактивної речовини у печінці — (61,1±4,4) і (43,0±4,1) % дози, селезінці — (6,4±1,1) і (9,2±0,2) % дози та легенях — (4,8±0,1) і (14,3±1,7) % дози. Через 6 год вміст радіоактивної речовини у крові знижувався в 10 разів (до 2 % дози), проте залишкове нагромадження в органах становило 10–20 % введеної дози. Виявлено, що печінка нагромаджувала радіоактивну речовину в найбільшому об'ємі незалежно від розміру ліпосом, хоча з виразною вибірковістю щодо маленьких ліпосом. Разом із тим, у селезінці та легенях об'єм нагромадження ГМДП-¹²⁵I у великих ліпосомах значно переважав такий для маленьких ліпосом (відповідно у 2,5 і 6,8 разу більше). Помірні показники вмісту радіоактивної речовини в кишечнику зберігалися протягом усього терміну спостереження з максимумом через 60–120 хв після введення (до 4–7 % дози), тимчасом як рівень присутності мітки в нирках залишався сталим і низьким (1,5–3 % дози).

З огляду на результати дослідження фармакокінетики у крові та тканинного розподілу ГМДП-¹²⁵I можна стверджувати, що елімінація ліпосомального пептиду із крові мишей відбувалася переважно внаслідок швидкого нагромадження в органах й уповільненого виведення через кишечник і нирки. Тканинний кліренс та інтегральні показники затримки пептидної мітки в органах ($AUC_{орган}$) безпосередньо залежали від розміру ліпосом, що свідчить про прискорене виведення великих ліпосом із кровотоку й організму порівняно з маленькими ліпосомами.

Таким чином, відповідно до фізіологічної моделі біорозпо-



Розподіл вільного ГМДП-¹²⁵I по органах мишей,
% від введеної дози, M±m

Час після введення, хв	Кров	Печінка	Селезінка	Легені	Нирки	Тонкий кишечник	Разом, % дози
5	12,6±2,4	6,70±0,19	0,10±0,01	1,2±0,1	26,2±3,4	6,2±0,7	53,4
30	2,80±0,40	1,4±0,3	0,05±0,01	0,30±0,04	4,60±0,04	6,3±0,5	15,5
60	0,90±0,60	0,8±0,1	0,020±0,002	0,10±0,01	2,50±0,03	11,8±0,5	16,3
120	0,50±0,04	1,0±0,2	0,020±0,002	0,08±0,01	1,30±0,03	8,7±0,8	11,6
180	0,30±0,05	0,30±0,03	0,010±0,001	0,07±0,01	1,60±0,03	2,5±0,5	4,8
360	0,10±0,02	0,2±0,1	0,010±0,002	0,06±0,01	0,20±0,01	0,3±0,1	1,0

Таблиця 3

Розподіл ГМДП-¹²⁵I в ліпосомах
із яєчного фосфатидилхоліну по органах мишей,
% від введеної дози, M ± m

Час після введення, хв	Кров	Печінка	Селезінка	Легені	Нирки	Тонкий кишечник	Разом, % дози
ГМДП у ліпосомах малого розміру							
5	21,7±1,0	61,1±4,4	6,4±1,1	4,8±0,1	1,5±0,3	2,1±0,3	98,5
30	12,4±1,3	23,5±1,7	2,1±0,4	1,3±0,3	1,4±0,1	3,6±0,3	44,8
60	8,8±1,4	17,3±2,5	2,5±0,5	1,3±0,4	1,3±0,1	2,4±0,1	33,9
120	4,6±0,7	20,5±4,6	2,9±0,8	1,5±0,2	1,5±0,3	4,4±0,4	35,6
180	2,6±0,2	20,2±1,7	2,2±0,3	1,0±0,1	1,5±0,1	3,9±0,5	31,7
360	1,9±0,2	7,8±1,8	0,6±0,1	0,30±0,04	0,50±0,03	1,8±0,2	12,9
ГМДП у ліпосомах великого розміру							
5	16,5±0,7	43,0±4,1	9,2±0,2	14,3±1,7	3,9±0,6	3,4±0,5	91,5
30	9,6±0,8	30,6±4,3	5,7±0,7	10,2±1,2	2,0±0,2	6,6±0,8	65,7
60	4,3±0,5	18,2±2,4	6,0±0,5	8,4±0,9	3,2±0,4	7,7±0,6	48,9
120	3,4±0,5	20,4±1,6	6,9±0,5	7,0±1,0	2,5±0,1	6,9±0,6	48,4
180	2,7±0,4	20,0±2,2	4,7±0,6	6,9±1,0	1,0±0,1	6,4±0,7	43,1
360	1,9±0,5	13,6±1,5	3,5±0,1	4,8±0,3	0,70±0,04	2,7±0,3	27,5

ділу ліпосом як транспортної форми лікарських засобів [9] і зважаючи на певні застереження при інтерпретації результатів дослідів із використанням радіоактивних похідних, основними факторами, що визначають ефект пролонгації знаходження у кровотоці ліпосомального ГМДП-¹²⁵I порівняно з вільним пептидом, є гальмування процесу виведення з організму внаслідок затримки, нагромадження та біотрансформації ліпосом у крові й органах (печінці, селезінці, легенях) дослідних тварин. Залежність тканинного розподілу пептиду від розміру ліпосом узгоджується з раніше отриманими даними [10] і передба-

чає можливість вибору ліпосомальної форми для досягнення ефективної концентрації пептиду в певному органі. Більше того, принципові відмінності фармакокінетичної поведінки пептиду у вільному стані та ліпосомальній формі дають підстави вважати, що саме затримка та поглинання клітинами моноцитарно-макрофагальної системи зумовлює наявний терапевтичний ефект ліпосомального пептиду.

Висновки

1. ГМДП-¹²⁵I у вільному стані швидко розподіляється та елімінується із крові й організму тварин.

2. Включення в ліпосоми із фосфатидилхоліну підвищує рівень знаходження ГМДП-¹²⁵I в організмі переважно внаслідок збільшення терміну напіввиведення $t_{1/2\beta}$, площі під фармакокінетичною кривою AUC і часу утримання MRT.

3. Включення в ліпосоми із фосфатидилхоліну підвищує тканинну доступність ГМДП-¹²⁵I. Розподіл ліпосом по органах призводить до затримки і нагромадження пептиду в печінці, селезінці, легенях.

ЛІТЕРАТУРА

1. MDP and other mucopeptides — direct and synergistic effects on the immune system / S. Traub, S. von Aulock, T. Hartung, C. Hermann // J. Endotoxin Res. — 2006. — Vol. 12 (2). — P. 69-85.

2. Механизм действия и клиническая эффективность иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида (Ликопида) / В. Т. Иванов, Т. М. Андреева, В. А. Несмеянов [и др.] // Клиническая медицина. — 1997. — № 3. — С. 11-15.

3. Дудниченко А. С. Ліпосомальні лікарські препарати в експерименті і клініці / А. С. Дудниченко, Ю. М. Краснопольский, В. І. Швець. — Х. : Вид. гр. «РА-Каравелла», 2001. — 144 с.

4. Влияние ГМДП, заключенного в липосомы, на метастазирование карциномы легкого Льюис / Ю. В. Уманский, А. В. Стефанов, О. П. Бондарь [и др.] // Экспериментальная онкология. — 1988. — Т. 10 (5). — С. 40-43.

5. Эффект ГМДП, аналога мурамилдипептида, заключенного в липосомы различного состава, на функциональную активность макрофагов / А. В. Стефанов, О. П. Бондарь, Ю. В. Уманский [и др.] // Украинский био-



химический журнал. — 1989. — Т. 61 (6). — С. 63-69.

6. Lasic D. D. Liposomes: from physics to applications / D. D. Lasic. — Amsterdam : Elsevier Science Publishers B. V., 1993. — P. 347-397.

7. Myramyl peptides bind specifically to rat brain membranes / A. A. Kaydalov, Yu. N. Utkin, T. M. Andronova [et al.] // FEBS Lett. — 1989. — Vol. 248 (1-2). — P. 78-82.

8. Factors limiting the oral bioavailability of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl dipeptide (GMDP) and enhancement of absorption in rats by delivery in a water-in-oil microemulsion / K. C. Lyons, W. N. Charman, R. Miller, C. J. Porter // Int. J. Pharm. — 2000. — Vol. 199 (1). — P. 17-28.

9. Comparative pharmacokinetics of free muramyl tripeptide phosphati-

dyl ethanolamine (MTP-PE) and liposomal MTP-PE / B. Gay, J.-M. Cardot, C. Schnell [et al.] // J. Pharm. Sci. — 1993. — Vol. 82 (10). — P. 997-1001.

10. Enhancing effect of cholesterol on the elimination of liposomes from circulation is mediated by complement activation / T. Ishida, K. Funato, S. Kojima [et al.] // Int. J. Pharm. — 1997. — Vol. 156. — P. 27-37.

УДК 611.37-053.1-07

О. М. Слободян, Ю. Т. Ахтемійчук, Ю. Є. Роговий

КОРЕЛЯЦІЙНИЙ АНАЛІЗ МОРФОМЕТРИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ У ЧОТИРИМІСЯЧНИХ ПЛОДІВ

Буковинський державний медичний університет, Чернівці

Вступ

Однією з основних причин перинатальної та дитячої смертності, різноманітних форм інвалідності є природжені вади [1; 2]. Частота їх в Україні становить 20,3 на 1000 новонароджених [3; 4]. Завдяки своєчасному виявленню аномальних плодів за допомогою сучасних методів пренатальної діагностики практично можливо втричі знизити популяційну частоту природжених вад та їх питому вагу в структурі перинатальної смертності, дитячої інвалідності, тяжких захворювань, що має велике медико-біологічне та соціально-економічне значення [5]. Ембріональний розвиток включає прогресивний ряд певних явищ. Знання попередніх стадій і визначення напрямку процесів органогенезу, при яких наслідки однієї стадії перетворюються в умови наступної, є безумовним фактором, що сприяє глибокому їх розумінню [6].

Для визначення закономірностей процесів органогенезу підшлункової залози (ПЗ) слід звернути увагу на особливості морфометричних змін у періо-

ди її прискороеного (5-й та 8–10-й місяці) та сповільненого (6–7-й місяці) розвитку [7; 8]. При цьому потребує особливої уваги вивчення початкових стадій плодового періоду, що слугуватиме для подальшого аналізу наступних етапів органогенезу. Проте кореляційний та багатфакторний регресійний аналіз морфометричних параметрів ПЗ 4-місячних плодів майже не проводився.

Мета роботи — провести аналіз кореляційних і багатфакторних регресійних взаємозв'язків морфометричних параметрів анатомічних частин ПЗ у 4-місячних плодів.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на 7 трупах 4-місячних плодів згідно з методичними рекомендаціями «Дотримання етичних та законодавчих норм і вимог при виконанні наукових морфологічних досліджень» [9] методами макромікропрепарування, виготовлення топографо-анатомічних зрізів у трьох взаємно перпендикулярних площинах, морфометрії. За допомогою

штангенциркуля вимірювали 7 можливих параметрів ПЗ: довжину ПЗ (від голівки до хвоста), довжину і ширину її голівки, тіла та хвоста (рис. 1). Статистичну обробку даних, включаючи кореляційний та багатфакторний регресійний аналізи, проводили за допомогою комп'ютерних програм "Statgraphics", "Excel 7.0" і "Statistica". Дослідження проведено у рамках науково-дослідної роботи Буковинського державного медичного університету «Статев-

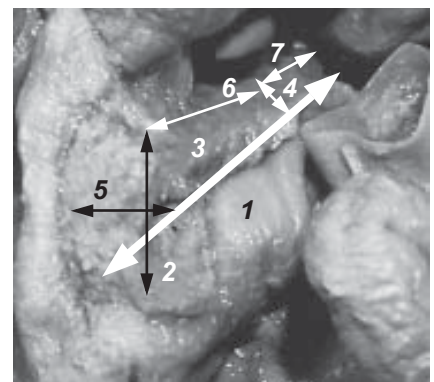


Рис. 1. Досліджувані параметри: довжина підшлункової залози (1), голівки (2), тіла (3), хвоста (4), ширина голівки (5), тіла (6), хвоста (7)

