

## ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В МОЗГ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ

Р. Н. Аляутдин<sup>1</sup>, Й. Кройтер<sup>2</sup>, Д. А. Харкевич<sup>1</sup>

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является труднопреодолимым препятствием для значительного числа лекарственных средств, включая большинство противоопухолевых средств, пептидов, нуклеиновых кислот [1, 3, 23]. В связи с этим затрудняется эффективное лечение таких тяжелых заболеваний как опухоли мозга, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Крейцфельда-Якоба и ряда других. Основой ГЭБ являются эндотелиальные клетки, выстилающие капилляры головного мозга. Между собой эти клетки соединены плотными контактами, предотвращающими параклеточное проникновение веществ через барьер, что препятствует свободной диффузии растворов в мозг. Кроме того, эндотелиальные клетки содержат ферменты, метаболизирующие химические соединения, подобные цитохрому Р-450, а также моноаминоксидазу. Наконец, в этих клетках обнаружены транспортные системы, “выкачивающие” вещества из цитоплазмы в просвет сосудов — Р-гликопротеин, транспортер органических кислот, выводящие из ЦНС нейротоксины и лекарственные вещества [9, 19, 31].

Предпринималось много попыток преодолеть ГЭБ. К числу их относится химическая модификация лекарственных веществ [11, 25] или “открытие” ГЭБ с помощью осмотического шока [8, 14, 30]. Еще одной попыткой явилось использование липосом для доставки лекарств в мозг [9, 25, 33]. Однако использованные методы не могли обеспечить оптимальную доставку лекарственных веществ, не проникающих в мозг.

Альтернативой представляется использование с этой целью наночастиц. Наночастицы — твердые коллоидные частицы размером от 1 до 1000 нм (1 мкм) [22]. Они состоят из полимерного материала, в частности, полицианоакрилата, в котором активное начало растворено, включено, инкапсулировано или сорбировано на поверхности наночастиц. Таким образом, наночастицы могут использоваться как носители лекарственных веществ или как адьюванты для вакцин.

### Использование наночастиц для доставки лекарственных веществ в мозг

В экспериментах S. D. Troster и соавт. [17, 34, 35] показано, что сорбция сурфактантов на поверхности <sup>14</sup>C-полиметилметакрилатных наночастиц изменяет их распре-

деление в организме. Позже, используя те же наночастицы, G. Borchard и соавт. (1994) наблюдали их захват изолированными эндотелиальными клетками капилляров головного мозга при модификации поверхности наночастиц полисорбатом 80 (твин 80). При использовании других сурфактантов (полоксамеры 184, 188 и 407) этот феномен не был отмечен [7, 10].

Способность наночастиц, покрытых полисорбатом 80, проникать через эндотелий в головной мозг была исследована в опытах *in vivo*. С этой целью исследовалась способность полибутилцианоакрилатных наночастиц доставлять через ГЭБ гексапептид даларгин [2, 3, 23]. Даларгин (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) является аналогом лей-энкефалина и, подобно другим энкефалинам, проявляет анальгетическую активность при введении в желудочки головного мозга. Однако при системном введении даларгин не оказывает центрального действия в дозах до 20 мг/кг [21]. Таким образом, даларгин не проникает через ГЭБ или если проникает, то в дозах не достаточных для возникновения антиноцицептивного действия.

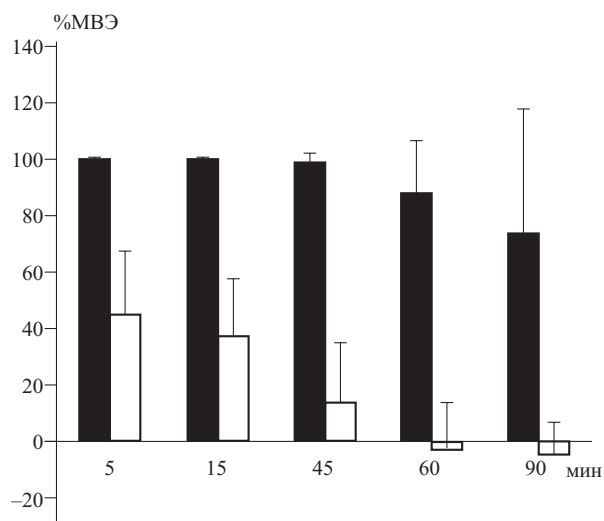
Однако при сорбции даларгина на поверхности полибутилцианоакрилатных наночастиц и последующей сорбции полисорбата 80 анальгетическое действие было отмечено после его внутривенного введения. Антиноцицептивный эффект оценивали с помощью метода отдергивания хвоста [1, 23, 26]. Налоксон устранял анальгетическое действие сорбированного на наночастицах даларгина. Дополнительным доказательством центрального генеза наблюдаемого феномена было появление эффекта Штрауба. В контрольных экспериментах сорбированный на наночастицах даларгин без полисорбата 80 не вызывал анальгезию. Аналогично не вызывали эффекта смешанные перед введением компоненты без предварительной сорбции на частицах.

Эти результаты были подтверждены в опытах V. Schroder и B. A. Sabel [32], использовавшими тест “горячая пластина”, однако в их экспериментах латентный период анальгетического действия был короче, чем в опытах J. Kreuter и соавт. [24] и R. N. Alyautdin и соавт. [3]. Эти различия могут быть обусловлены различными линиями использованных животных.

В последующих экспериментах выяснялось, является ли феномен с даларгином частным примером или наночастицы можно использовать для транспорта через ГЭБ в мозг соединений с иной структурой и другими физико-химическими свойствами. Следующим лекарственным веществом был лоперамид [4]. Лоперамид был выбран в связи с тем, что подобно даларгину он не проникает через ГЭБ. Однако его химическая структура и физико-химические свойства отличны от даларгина. Это не пептид, он плохо растворяется в воде. При подкожном и внутривенном введении 10 % раствор лоперамида в пропиленгликоле не вызывал анальгезию в тесте отдергивания хвоста. Зависимые от дозы анальгезию и эффект

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии фармацевтического факультета и кафедры фармакологии лечебного факультета Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова, Москва, 119881, ул. Б. Пироговская, 2/6.

<sup>2</sup> Институт фармацевтической технологии Университета Вольфганга Гете, Франкфурт на Майне.



**Рис. 1.** Анальгетическое действие полибутилацианоакрилатных наночастиц, содержащих лоперамид (3,6 мг/кг) и покрытых полисорбатом 80, и раствора лоперамида (3,6 мг/кг) в 1 % растворе полисорбата 80.

Порог болевой чувствительности определяли методом отдергивания хвоста в экспериментах на мышах. Анальгетическую активность оценивали посредством расчета максимально возможного эффекта (МВЭ). Статистическую значимость рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Темные столбики — лоперамид в наночастицах, светлые — раствор лоперамида.

Штрауба наблюдали при включении лоперамида в наночастицы, покрытые полисорбатом 80. Раствор лоперамида в полисорбате 80 вызывал значительно менее выраженное действие (рис. 1).

В следующей серии экспериментов для транспорта в мозг был использован тубокурарин — полярное высокогидрофильное соединение [5]. Известно, что тубокурарин, четвертичное аммониевое основание, при системном введении не проникает в мозг [5], однако, при введении в желудочки мозга вызывает появление судорожных волн на ЭЭГ [25]. Способность полибутилацианоакрилатных наночастиц доставлять тубокурарин в мозг исследовали в опытах *in situ* в условиях перфузии головного мозга. Об эффективности судили по изменению ЭЭГ. Судорожные волны на ЭЭГ были зарегистрированы через 15 мин после добавления в перфузат суспензии наночастиц, содержащих тубокурарин и покрытых полисорбатом 80. Введение раствора тубокурарина в желудочки мозга приводило к возникновению судорожных волн на ЭЭГ через 5 мин. В контрольных экспериментах ни раствор тубокурарина, ни наночастицы, содержащие тубокурарин, но без полисорбата 80, при добавлении в перфузат не вызывали изменений ЭЭГ. Таким образом, транспорт тубокурарина в мозг наночастицами возможен только при наличии полисорбата 80.

В отдельной серии экспериментов оценивали эффективность транспорта с помощью наночастиц доксорубицина, одного из эффективных противоопухолевых веществ [25]. Концентрация доксорубицина в головном мозге через 120–240 мин после введения была очень высокой (более 6 мкг/г ткани) только в случае использования наночастиц, покрытых полисорбатом 80, в то время

как при введении раствора доксорубицина или наночастиц без полисорбата 80 концентрация в тканях мозга не превышала 0,1 мкг/г ткани. Одновременно с увеличением концентрации доксорубицина в мозге снижалось его содержание в сердце, что предполагает возможность уменьшения выраженности побочных эффектов.

### Механизм транспорта лекарственных веществ через ГЭБ с помощью наночастиц

Механизм, посредством которого наночастицами осуществляется транспорт веществ в мозг, не ясен. Можно предположить наличие нескольких факторов, способствующих облегчению транспорта лекарств наночастицами: абсорбция наночастиц на стенках сосудов мозга без транспорта частиц через эндотелий, что создает высокую локальную концентрацию транспортируемого средства; изменение проницаемости мембран эндотелия капилляров головного мозга под влиянием полисорбата 80; отрывание “плотных контактов” между эндотелиальными клетками сосудов мозга; эндоцитоз наночастиц эндотелиальными клетками; блокада Р-гликопротеина полисорбатом 80. Возможна комбинация перечисленных факторов.

Гипотеза о возможной адгезии наночастиц к сосудам была высказана S. D. Troster и соавт [25, 35]. Адгезия наночастиц к слизистой оболочке склеры и конъюнктивы описаны в литературе [16, 20–22] и используется для создания пролонгированных форм лекарственных средств, используемых в офтальмологии [16, 27, 38–40]. Однако увеличение транспорта лекарств в ткани глаза значительно меньше по сравнению с описанным транспортом в мозг. Кроме того, в ряде случаев наночастицы уменьшали транспорт лекарственных средств в ткани глаза [25, 41].

Оценку значения полисорбата 80 для увеличения транспорта лекарственных препаратов в мозг провели, выполнив эксперименты с наночастицами, содержащими даларгин, но покрытыми другими сурфактантами. С этой целью использовали близкие по строению к полисорбату 80 полисорбаты 20, 40 и 60, а также полоксамеры 184, 188, 388, 407, полоксамины 908, Brij 35, кремофор EZ. При использовании методики отдергивания хвоста повышение порога болевой чувствительности у животных было отмечено только при введении наночастиц, содержащих даларгин и покрытых полисорбатами 20, 40, 60 и 80. Остальные сурфактанты были неэффективны [3].

Следующим объяснением увеличения транспорта лекарственных средств через ГЭБ может быть открывание “плотных” контактов между эндотелиальными клетками сосудов головного мозга. Эти контакты могут быть открыты, например, гипертоническими растворами, что приводит к увеличению проникновения химических соединений в мозг [23, 25, 30]. Открывание “плотных” контактов может оцениваться посредством измерения “инулинового объема” — количества меченого инулина, проникшего в ткани мозга через ГЭБ. При открывании “плотных” контактов этот объем увеличивается в 10–20 раз. В экспериментах R. N. Alyautdin и соавт. [6] инулиновый объем после введения наночастиц, покрытых полисорбатом 80, увеличился в значительно меньшей степени: через 10 мин в 1, 1 раза и через 30 мин — в 2 раза.

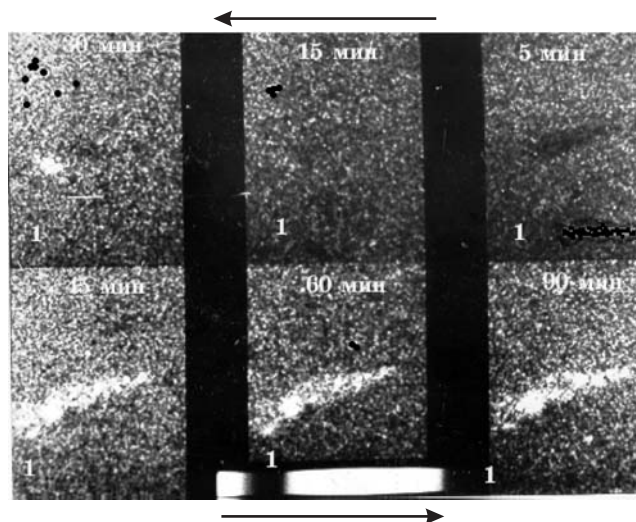
Лишь небольшое увеличение объема распределения меченого инулина свидетельствует об отсутствии значительного повреждения ГЭБ наночастицами. Однако возможность некоторого открывания “плотных” контактов, учитывая полученные результаты, нельзя исключить.

Включенные в коллоидные носители лекарственные вещества могут проникать через ГЭБ в мозг за счет эндоцитоза эндотелиальными клетками капилляров головного мозга. Эти клетки принадлежат ретикулоэндотелиальной системе и в определенных условиях способны к эндоцитозу [25]. Так, захват этими клетками липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) является важной функцией, обеспечивающей головной мозг необходимыми липидами. Наличие рецепторов к ЛПНП на поверхности эндотелия мозга было показано с помощью иммунохимических методов, а в спинномозговой жидкости были обнаружены аполипопротеины E и A<sub>1</sub> [15, 25].

В наших экспериментах *in vitro* с полибутилцианоакрилатными наночастицами эндоцитоз изолированными клетками эндотелия сосудов головного мозга крыс наблюдали только при модификации поверхности наночастиц полисорбатом 80 (см. рис. 2). Без полисорбата 80 эндоцитоз не был отмечен даже при 10-кратном увеличении концентрации наночастиц [6]. В опытах *in vivo* при использовании наночастиц, содержащих флуоресцентный маркер, с помощью флуоресцентной и электронной микроскопии в эндотелии сосудов головного мозга были обнаружены структуры, которые могли быть наночастицами. Однако для более достоверных выводов необходимо создание более надежных маркеров наночастиц [3].

Проникновение наночастиц в клетки могло быть стимулировано ЛПНП, сорбирующимися на их поверхности. Особый интерес представляет аполипопротеин E, являющийся лигандом ЛПНП-рецепторов. Для проверки этой гипотезы полибутилцианоакрилатные наночастицы инкубировали в плазме человеческой крови, затем сорбированные на них компоненты плазмы отмывали и анализировали состав. При использовании электрофореза в полиакриламидном геле было показано, что на поверхности наночастиц сорбировался аполипопротеин E. Однако это происходило только в том случае, если наночастицы были предварительно покрыты полисорбатами 20, 40, 60, или 80 [28]. Ранее было отмечено, что использование только этих сурфактантов приводило к возникновению анальгетического эффекта в опытах с даларгином. Использование иных сурфактантов не вызывало развития анальгезии и не приводило к сорбции аполипопротеина E на поверхности наночастиц [28]. Представленные данные показывают, что модификация поверхности наночастиц полисорбатами 20, 40, 60 и 80 приводит к сорбции на их поверхности аполипопротеина E и, возможно, других компонентов плазмы. В результате наночастицы приобретают способность к взаимодействию с рецепторами к ЛПНП, расположенным на поверхности эндотелиальных клеток [25].

После эндоцитоза доставка лекарственного препарата к нейронам головного мозга может обеспечиваться после десорбции с поверхности наночастиц, которые в свою очередь могут разрушаться, т.к. составляющий матрицу полимер очень быстро биодegradирует [13, 18]. Лекарст-



**Рис. 2.** Накопление флуоресцентных наночастиц, покрытых полисорбатом 80, в изолированной клетке эндотелия сосудов головного мозга.

Регистрация производилась через 5, 15, 30, 45, 60 и 90 мин после введения в питательную среду суспензии наночастиц. В верхнем ряду фотографии расположены справа налево, в нижнем — слева направо. 5 мин — наночастицы создают флуоресцирующую среду, эндотелиальная клетка видна как темная тень. 15 мин — появляются отдельные участки флуоресценции в клетке. 30 мин — накопление флуоресцентного материала в клетке. 45 мин — флуоресценция внутри клетки максимальна. 60–90 мин — постепенное снижение интенсивности флуоресценции. Конфокальная сканирующая микроскопия. 1 — эндотелиальная клетка.

венный препарат после десорбции и разрушения наночастицы распространяется посредством диффузии.

P-гликопротеин, находящийся в апикальной мембране эндотелиальных клеток сосудов головного мозга представляет транспортную систему, “выкачивающую” липофильные соединения в просвет сосудов [12]. Многие авторы связывают развитие мультирезистентности опухолей к химиотерапии с наличием этой “помпы” [36, 37, 42]. Показано, что сурфактанты, включая полисорбат 80, ингибируют эту транспортную систему, предотвращая развитие мультирезистентности [29, 36, 37]. Однако в наших экспериментах взаимодействие полисорбата 80 и P-гликопротеина имело значение в экспериментах с лоперамидом и доксорубицином, которые являются субстратом для P-гликопротеина.

Таким образом, полибутилцианоакрилатные наночастицы, покрытые полисорбатом 80, способны транспортировать содержащиеся в них соединения через ГЭБ. В наших экспериментах к числу таких соединений относятся даларгин, лоперамид, тубокурарин и доксорубицин. Механизм транспорта в деталях не ясен, однако, наиболее вероятным путем транспорта является эндоцитоз эндотелиальными клетками капилляров головного мозга. Очевидно исследованные наночастицы взаимодействуют с рецепторами к ЛПНП и могут быть поглощены эндотелиальными клетками. После эндоцитоза лекарственные вещества выделяются в результате десорбции или разрушения наночастиц. Кроме того, наночастицы могут подвергаться транцитозу, подобно ЛПНП.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Р. Н. Аляутдин, В. Е. Петров, К. Лангер, А. Бертольд и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, № 1, 17 – 19, (1998).
2. Р. Н. Аляутдин, *Российский мед. ж.*, № 2, 3 – 7 (2001).
3. R. N. Alyautdin, V. Petrov, D. A. Kharkevich, and J. Kreuter., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **41**, 44 – 48, (1995).
4. R. N. Alyautdin, V. E. Petrov, K. Langer, A. Berthold, et al., *Pharm. Res.*, **14**, 325 – 328, (1997).
5. R. N. Alyautdin, E. B. Tezikov, P. Ramge, D. A. Kharkevich, et al., *J. Microencapsulation*, **15**, 67 – 74, (1998).
6. R. N. Alyautdin, A. Reichel, R. Lobenberg, P. Ramge, et al., *J. Drug Target.*, **9**(3), 209 – 221, (2001).
7. L. Araujo, R. Lobenberg, J. Kreuter., *J. Drug Target.*, **5**, 373 – 385, (1999).
8. D. J. Begley, *Prog. Brain Res.*, **91**, 163 – 169, (1992).
9. E. Bigoa, E. Borato, A. Bruni, A. Leon, G. Toffano, *Br. J. Pharmacol.*, **66**, 167 – 174, (1979).
10. G. Borchardt., K. L. Audus, F. Shi, J. Kreuter., *Int. J. Pharm.*, **110**, 29 – 35, (1994).
11. N. Bodor, E. Shek, T. Higuchi, *Science*, **190**, 115 – 156, (1975).
12. C. Cordon-Cardo, J. P. O'Brien, D. Casals, L. Rittmann-Grauer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 695 – 698, (1989).
13. P. Couvreur, L. Grislain, V. Lenaerts, and F. Brasseur, in: *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*. Boca Raton, P. Guiot, P. Couvreur (eds.), FL: CRS Press (1986), pp. 27 – 93.
14. J. E. Cremer and M. P. Cereb., *Blood Flow Metab.*, **3**, 254 – 256, (1983).
15. B. Dehouck, C. Fenart, M.-P. Dehouck, and A. Pierce, *J. Cell Biol.*, **138**, 887 – 889, (1997).
16. R. Diepold, J. Kreuter, J. Himberg, R. Gurny, et al., *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **1** 227, 188 – 193, (1989).
17. R. Diepold, J. Kreuter, P. Guggenbihl, and J. R. Robinson. *Int. J. Pharm.*, **54**, 149 – 153, (1989).
18. L. Grislain, P. Couvreur, V. Lenaerts, and M. Roland, *Int. J. Pharm.*, **15**, 335 – 345, (1983).
19. M. M. Gottesman and I. Pastan., *Annu Rev Biochem.*, **62**, 682 – 684, (1993).
20. J. D. Fenstermacher, P. Gross, N. Sposito, V. Acuff, et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, **529**, 21 – 30, (1988).
21. E. Kalenikova, O. Dmitrieva, N. Korobov, et al., *Vopr. Med. Khim.*, **34**, 75 – 83, (1988).
22. J. Kreuter, Nanoparticles, in: *J Swarbrick, JC Boylan (eds.), Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Vol 10, New York: Marcel Dekker, 1994, 165 – 190.
23. J. Kreuter, R. N. Alyautdin, D. A. Kharkevich, and A. A. Ivanov, *Brain Res.*, **674**, 171 – 174 (1995).
24. J. Kreuter, V. E. Petrov, D. A. Kharkevich, and R. N. Alyautdin., *J. Controlled Rel.*, **49**, 81 – 87, (1997).
25. J. Kreuter, R. N. Alyautdin, in: *The Blood Brain Barrier and Drug Delivery to the CNS*, ed. D. J. Begley, Marcel Dekker, 2000.
26. K. Langer, E. Mutschler, G. Lambrecht, D. Mayer и др., *Int. J. Pharm.*, **158**, 219 – 231, (1997).
27. V. Li, R. W. Wood, J. Kreuter, T. Harmia и др., *J. Microencapsul.*, **3**, 213 – 218, (1986).
28. M Luck, *Plasmaproteinadsorption als moglicher Schliisselfaktor fur eine kontrollierte Arzneistoffapplikation mil partikularen Tragern*. Ph. D. thesis, Freie Universitat Berlin (1997), pp. 130 – 154.
29. M. M. Nerurkar, P. S. Burto, and R. T. Borchardt, *Pharm. Res.*, **13**, 528 – 534, (1996).
30. E. A. Neuwelt, P. A. Barnett. In: E. A. Neuwelt, ed., *Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation*, Vol 2, New York: Plenum Press, (1989).
31. A. Schinkel, E. Wagenaar, L. van Deemter, P Borst., *J. Clin. Invest.*, **97**, 2517 – 2524, (1996).
32. V. Schroder and B. A. Sabel, *Brain Res.*, **674**, 121 – 124, (1996).
33. Z. A. Tokes, A. Kulcsar, and S. Peteri, J. A. Todd, *Brain Res.*, **188**, 282 – 286 (1980).
34. S. D. Troster, U. Miiller, and J. Kreuter., *Int. J. Pharm.*, **61**, 85 – 100 (1990).
35. S. D. Troster and J. Kreuter., *J. Microencapsulation*, **9**, 19 – 28, (1992).
36. D. M. Woodcock, S. Jefferson, M. E. Linsenmeyer, P. J. Crowther, et al., *Cancer Res.*, **50**, 4199 – 4203 (1990).
37. D. M. Woodcock, M. E. Linsenmeyer, G. M. Chojnowski, A. B. Kriegler, *Br. J. Cancer.*, **66**, 62 – 68, (1992).
38. A. Zimmer, E. Mutschler, G. Lambrecht, D. Mayer, *Pharm. Res.*, **11**, 1435 – 1442, (1994).
39. A. K. Zimmer, H. Zerbe, J. Kreuter., *J. Controlled Release*, **32**, 57 – 70, (1994).
40. A. K. Zimmer, P. Chetoni, M. F. Saettone, H. Zerbe, и др., *J. Controlled Release*, **33**, 31 – 46, (1995).
41. A. K. Zimmer, P. Maincent, P. Thouvenot, J. Kreuter, *Int. J. Pharm.*, **110**, 211 – 222, (1994).
42. T. Zordan – Nudo, V. Ling, Z. Liv, E. Georges. *Cancer. Res.*, **53**, 5994 – 6000, (1993).

Поступила 17.02.03.

## DRUG DELIVERY TO BRAIN BY NANOPARTICLES

R. N. Alyautdin<sup>1</sup>, J. Kreuter<sup>2</sup>, and D. A. Kharkevich<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sechenov Medical Academy, ul. Bol'shaya Pirogovskaya 2/6, Moscow, 119881 Russia;

<sup>2</sup> Institute of Pharmaceutical Technology, Wolfgang Goethe University, Frankfurt am Main, Germany

Drugs can be delivered to brain with the aid of poly(butylcyanoacrylate) (PBCA) nanoparticles coated with polysorbate 80. These carriers can penetrate BBB and deliver drugs of various structures, including peptides, hydrophilic compounds, and lipophilic compounds eliminated from brain with P-glycoprotein. When a suspension of polysorbate-coated PBCA nanoparticles is introduced into blood, apolipoproteins of the blood plasma adsorb on the particle surface and then interact with receptors of low-density lipoproteins situated in endothelial cells of cerebral vessels, thus stimulating endocytosis.