

Визначення біодоступності субстанції гліцерам

на моделі моношару клітин лінії Caco-2.

Малоштан Л.М., Шаталова О.М., Рухмакова О.А., Шакіна Л.О.

Кафедра фізіології та анатомії людини

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Shatalov_leha@ukr.net

Ключові слова: екстракт кореня солодки, гліцерам, біофармацевтична система класифікації, біодоступність.

Гліцерам - моноаммонійна сіль гліцирризинової кислоти, яка отримана з коренів солодки голої (*Glycyrrhiza glabra*). Активна речовина кореня солодки - гліцирризинова кислота (глицирризин) це тритерпеновий глікозид [1], який має широкий спектр фармакологічної активності [2, 3, 4]. Однак, виразність активності залежить від багатьох фармакокінетичних характеристик препарату, зокрема від біодоступності. Біодоступність в фармакології відображає здатність лікарської речовини засвоюватися в організмі [5, 6].

У процесі розробки лікарських засобів можна встановити ступінь абсорбції субстанції лікарського засобу шляхом вимірювання проникності на штучних мембранах *in vitro* з використанням культур клітин. Клітини колоноректальної аденокарциноми людини Caco-2 є «золотим стандартом» для оцінки проникності лікарських речовин завдяки можливості відтворювати більшість властивостей і характеристик диференційованих епітеліальних клітин кишечника [7; 8] та найчастіше використовується за кордоном з метою вивчення біодоступності *in vitro* [9]. Прийнято вважати, що проходження ліків через кишковий епітелій (моношар клітин) є головним бар'єром для препарату на його шляху проникнення в систему кровообігу. *In vivo* ентероцити становлять приблизно 90 % клітин епітелію кишечника і переважно відповідають за абсорбційну функцію. Ентероцит є високо поляризованою клітиною. Апікальна поверхня шару ентероцитів звернена до люмінальної області кишечника, а базолатеральна поверхня контактує з током крові [10; 11].

Визначення біодоступності субстанції гліцерам проведено саме з використанням лінії клітин Caco-2. Дана модель надійний інструмент не лише для прогнозування кишкової проникності лікарської речовини, вона дозволяє встановлювати вплив допоміжних речовин і лікарської взаємодії на процеси всмоктування. Клітини Caco-2, які отримані з аденокарциноми товстого кишечника людини за певних умов проявляють морфологічні та функціональні властивості, аналогічні ентероцитам

кишечнику [9; 11; 12]. Клітини при культивуванні утворюють щільні контакти, експресують багато ферментів ворсистого шару, а також мають транспортні системами, притаманні ентероцитам тонкого кишечника, зокрема системи транспорту амінокислот, діпептидів, вітамінів і цитостатиків [12, 13].

У фармацевтичному секторі України впроваджена в практику біофармацевтична система класифікації (БСК) діючих речовин. Відповідно до існуючої БСК [14, 15], діючі речовини за їх розчинністю у різних середовищах і проникністю, розділені на 4 класи [6, 11, 16].

Оскільки існує різниця в коефіцієнтах проникності на епітеліоцитах Caco-2 для одного і того ж препарату, при вимірюваннях у різних лабораторіях, були обрані 10 маркерних сполук у Janssen Pharmaceutica. Для цих сполук визначили коефіцієнти проникності Lion Bioscience Inc. По ним будуються коригуючі криві при підрахунку вимірної в будь якій лабораторії проникності [11].

Матеріали та методи дослідження

На базі проблемної лабораторії морфофункціональних досліджень Національного фармацевтичного університету проведено дослідження біопроникності субстанції гліцерам, яка є біологічно-активною речовиною екстракта з кореня солодки голої. Даний екстракт отриманий на кафедрі технології ліків Рухмакової О.А. під керівництвом проф. Ярних Т.Г.

Процедура визначення проникності на культурі клітин Caco-2 складалася з наступних етапів: культивування клітин, інкубування клітин на мікропористому фільтрі (підготовка тест-системи), визначення тест-придатності системи (вимір трансепітеліального електричного опору, калібрування методу), визначення проникності дослідної субстанції у порівнянні з внутрішнім стандартом – пропранололом, кількісне визначення проникності дослідної субстанції методом ВРХ с УФ або МС-детектором.

Підготовка тест-системи до визначення проникності (вирощування культури клітин Caco -2 на пористому інсерті) проводилося протягом 24 діб. Стан і цілісність моношару контролювали за допомогою вимірювання електричного опору моношару Caco-2 за допомогою трансепітеліального вольтметра Millicell ERS-2 з використанням вимірювальної камери. Калібрування методу вивчення проникності речовин в умовах *in vitro* через моношар клітинної лінії Caco-2 проводилося за допомогою вимірювання транспорту тест-зразка субстанції пропранолол через епітеліальний моношар у вибраному годинному інтервалі. Визначення концентрації досліджуваної речовини, яка проникла через моношар, здійснювалося хроматографічним методом. Коефіцієнт

проникності моношару Сасо-2 для тест-зразка субстанції пропранололу обчислювали за формулою та порівнювали отримане значення зі стандартними. За даними літератури пропранололу є маркерним з'єднанням, що належать до 1 класу БСК [11, 14]. До того ж він інертний по відношенню до гліцеру.

Опір вимірювався на 3-ю, 7-у, 9-у, 11-у, 14-у, 17-у, 21-у добу після засіву клітинної культури на інсерт. Величина опору моношару визначалася в Ом із корекцією на опір порожнього (безклітинного моношару) інсрта. Для проведення дослідження було підготовлено 4 інсрта з моношаром Сасо -2. Після вимірювання опору моношару Сасо -2 розраховували коефіцієнт проникності моношару Сасо-2 для субстанції гліцеру.

Результати дослідження

Після 20-ти денного культивування справжній опір моношару Сасо-2 на обраних для експерименту інсртах становив в середньому $367,500 \pm 14,121$ Ом. Отримана величина опору відповідає даним, наведеним в літературі та підтверджує готовність моношару для вивчення адсорбції розчину субстанцій [10].

Відповідно до методичних рекомендацій [15] для калібрування методу у якості препарату порівняння було обрано речовину з високою проникністю через моношар клітинної лінії Сасо-2 (пропранололу гідрохлорид).

Для визначення концентрації субстанції пропранололу гідрохлориду хроматографічним методом були відібрані проби в пронумеровані віалки. Номер віалки відповідає номеру проби.

Отримані дані представлені у табл. 1-2.

Табл. 1

Концентрація субстанції пропранололу гідрохлориду у вибраному інтервалі часу

Тест-зразок	№ віалки	C_0 (мкг/мл)	Через 30 хв (мкг/мл)
Пропранолол	2	92,12042607	
	3	92,12042607	
	4		1,694717056
	5		1,49102083
	6		1,45676056
	7		1,60938704

C_0 - початкова концентрація субстанції пропранололу в віалках № 2, № 3; $C_{30 \text{ хв}}$ - концентрація субстанції пропранололу в віалках №№ 4-7, через 30 хвилин експозиції.

Розраховані коефіцієнти проникності наведені в табл. 2.

Коефіцієнт проникності субстанції пропранололу

Пропранолол	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4
Q, М	6,53E-009	5,75E-009	5,62E-009	6,21E-009
Q, нМ (10 ⁻⁹)	6,534730687	5,74928986	5,61718422	6,20570309
dQ/dt	3,63E-003	3,19E-003	3,12E-003	3,45E-003
c ₀ , нМ	3,55E-007	3,55E-007	3,55E-007	3,55E-007
P, см/с	1,70E-005	1,50E-005	1,70E-005	1,50E-005
M± m	1,60E-005±0,058 *			

P - коефіцієнт кишкової проникності, см/с;

C₀ - вихідна концентрація досліджуваної субстанції в донорному (апикальному) відсіку, М;

dQ/dT - швидкість зміни концентрації досліджуваної субстанції в акцепторному відсіку, нМ/с;

M - середнє арифметичне значення коефіцієнта проникності P, см/с; t - помилка середнього арифметичного.

* Отриманий коефіцієнт проникності задовольняє умовам валідації моношару Caco-2 [10].

Наведені дані свідчать, що отримане середнє значення проникності для субстанції пропранололу задовольняє умовам валідації моношару Caco-2 та підтверджує адекватність застосованої моделі, а також збереження властивостей моношару клітинної лінії Caco-2 під час проведення вимірювань проникності досліджуваної субстанції.

У даному експерименті вивчення проникності субстанції гліцерому через моношар клітинної лінії Caco-2 проводилося одночасно з калібрувальними вимірами. В експериментальних інсертах знаходився розчин субстанції пропранололу гідрохлориду 100 мкг/мл + розчин субстанції гліцерому 100 мкг/мл.

Для визначення концентрації субстанції гліцерому хроматографічним методом (метод завалідовано) були відібрані проби №№4-7 в пронумеровані віалки (4,5,6,7). Отримано такі дані табл. 3.

Таким чином, в експерименті з використанням моношару Caco-2 з характеристиками, що задовольняють стандартним вимогам, отримано середнє значення проникності гліцерому (7,755± 0,517)E-08 см/с. Отримане значення свідчить, що субстанція гліцерому має низьку проникність через епітеліальний шар кишечника (менше 50 %). Враховуючи результати попередніх досліджень в яких була встановлена висока розчинність гліцерому, можна віднести гліцером згідно з БСК до 3 класу [11].

Концентрація субстанції пропранололу гідрохлориду у вибраному інтервалі часу

Тест-зразок	№ віалки	C ₀ (мкг/мл)	Через 30 хв (мкг/мл)
гліцерам	2	88,42505417	
	3	88,42505417	
	4		0,0066
	5		0,0083
	6		0,0107
	7		0,0066

Розраховані коефіцієнти проникності наведені в табл.4

Коефіцієнт проникності субстанції гліцераму

Гліцерам	Проба 5	Проба 6	Проба 7	Проба 8
Q, М	7,97E-012	1,00E-011	1,30E-011	7,97E-012
Q, нМ (10 ⁻⁹)	0,007965666	0,010035482	0,01302469	0,00796567
dQ/dt	4,43E-006	5,58E-006	7,24E-006	4,43E-006
c ₀ , нМ	107,4514894	107,4514894	107,451489	107,451489
P	6,86E-008	8,65E-008	6,86E-008	8,65E-008
M± m	7,755± 0,517 E-08 см/с.			

P - коефіцієнт кишкової проникності, см/с;

C₀ - вихідна концентрація досліджуваної субстанції в донорному (апикальному) відсіку, М;

dQ/dT - швидкість зміни концентрації досліджуваної субстанції в акцепторному відсіку, нМ/с;

M - середнє арифметичне значення коефіцієнта проникності P, см/с; t - помилка середнього арифметичного.

Висновки

1. Вперше проведено визначення проникності субстанції гліцераму в умовах *in vitro* через моношар клітинної лінії Caco-2 з одночасним використанням тест - зразка субстанції пропранололу гідрохлориду.

2. Встановлено коефіцієнт проникності для субстанції **гліцераму, який дорівнює 7,755± 0,517 E-08 см/с.**

3. Результати представленої експерименту, свідчать про те, що субстанція гліцераму належить до категорії речовин, які мають низьку проникність через епітеліальний шар кишечника (менше 50 %).

4. Отримані дані обґрунтовують доцільність використання на основі гліцерама саме лікарських форм, які б минали бар'єр ентероцитів тонкого кишечника, зокрема песаріїв, гелів або кремів.

Перспективи подальших досліджень: експериментально визначити, як впливають різні домішки на біодоступність гліцераму. Вивчити можливість підвищення біодоступності гліцераму можливо шляхом додавання фосфоліпідних наночастинок [5].

Література:

1. Аммосов А.С. Природные тритерпеновые соединения родов *Glycyrrhiza* L. и *Meristotropis* Fisch. et Mey. (обзор) / А.С. Аммосов, В.И. Литвиненко // Фармаком. – 2002. – № 4. – С. 1–8.

2. Рухмакова О. А. Перспективи використання солодки голої в якості імуномодулюючого засобу у педіатрії / О. А. Рухмакова, Т. Г. Ярних // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2014. – № 1 (14). – С. 47-49;

3. Шакіна Л.О., Малоштан Л.М. Фармакологічне вивчення мазі з екстрактом кореня солодки голої на моделі неалергічного контактного дерматиту у щурів // Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція: тези доповідей I Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю (18 жовтня 2018 р.). – Х.: Вид-во НФаУ, 2018. – С 263-265.

4. Пат. на корисну модель № 95891 Україна, МПК А61К36/48, А61К9/06, А61Р31/12. Фармацевтична композиція у формі стоматологічного гелю з репаративною дією / Т. Г. Ярних, О. А. Рухмакова, Л. М. Малоштан, О. Ю. Яценко, І. О.; Бабенко ; заявл. і патентовл. НФаУ. – № u 201408185 ; заявл. 21.07.14 ; опубл. 12.01.15, Бюл. № 1. – 5 с.

5. Биодоступность пероральных лекарственных форм и способы ее повышения О.М. Ипатова, Т.И. Торховская, Н.В. Медведева, В.Н. Прозоровски // Биомедицинская химия, 2010 том 56, вып. 1, с. 101-119

6. Головенко М.Я. Біофармацевтична класифікаційна система / М.Я. Головенко, О.П. Баула, І.Ю. Борисюк. – К., 2010. – 300 с

7. Малоштан Л.М., Шаталова О.М., Шакіна Л.О. Використання клітинних культур в біофармацевтичних дослідженнях // The Third International scientific congress of scientists of Europe. Proceedings of the III International Scientific Forum of Scientists "East–West", January 11, 2019. Premier.

8. Шохин И.Е., Кулинич Ю.И., Раменская Г.В., Кукес В.Г. Применение биологической модели для оценки кишечной проницаемости in vitro монослоя эпителиальных клеток Caco-2 // Биомедицина. 2012. - №3. - С. 91.

9. Takenaka T. et al. Application of a Human Intestinal Epithelial Cell Monolayer to the Prediction of Oral Drug Absorption in Humans as a Superior Alternative to the Caco-2 Cell Monolayer Takenaka T., Harada N., Kuze J., Chiba M., Iwao T., Matsunaga T. // J Pharm Sci. 2016 Feb;105(2):915-924
10. Bock U. Flototto T. Haltner E. Validation of cell culture models for the intestine and the blood-brain barrier and comparison of drug permeation. ALTEX. 2004;21 Suppl 3:57-64
11. Раменская Г.В., Шохин И.Е., Савченко А.Ю., Кулинич Ю.И., Давыдова К.С. Биофармацевтическая модель оценки взаимозаменяемости воспроизведенных ЛС по их метаболизму и элиминации (BDDCS). // Биомедицина - 2011. - №2. - с.50.
12. Sambay Y., De Angelis I., Ranaldi G. et al. The Caco-2 cell line model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biology and Toxicology, 2005, 21, 1-26;
13. Natoli, M., et al., Good Caco-2 cell culture practices. Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, Zucco F, Felsani A. Toxicology in Vitro, 2012. 26(8): p. 1243-1246.
14. Методические указания «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств». М., МЗСР РФ, 2008.- 32 с.
15. Проведення порівняльних досліджень in vitro для підтвердження еквівалентності лікарських засобів у твердій дозованій формі системної дії. – Метод. рекомен. – К.: «Моріон», – 2007. – 41 с.
16. Гуреева С. М., Альбедхані О. С., Грошовий Т. А. Застосування біофармацевтичної системи класифікації у розробці нових лікарських препаратів // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2015. – № 3 (19). – С. 38–43.

Маркетинговий аналіз ринку льодяників на основі продуктів бджільництва

Матушак М.Р., Горошко О.М., Захарчук О.І., Ежнед М.А.

Кафедра фармацевтичної ботаніки та фармакогнозії

Вищий державний навчальний заклад України

«Буковинський державний медичний університет»

matushakmarta@gmail.com

Анотація. Засоби апітерапії знайшли широке застосування в найрізноманітніших розділах медицини, в т.ч. і в оториноларингології. У статті розглянуто переваги використання льодяників для зменшення больового симптому і запальних явищ у горлі