

Разработка и анализ липосомальной формы мелатонина для внутривенного введения

В.П. Агеев¹, О.А. Куликов¹, К.Г. Гуревич², В.И. Шляпкина¹, А.В. Заборовский²

¹Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Российская Федерация, 430005, Саранск, ул. Большевикская, д. 68;

²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Российская Федерация, 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Агеев Валентин Павлович – инженер лаборатории фармакокинетики Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева (НИМГУ). Тел.: +7 (927) 978-89-51. E-mail: valeageev@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-5152-5358

Куликов Олег Александрович – доцент кафедры фармакологии НИМГУ им. Н.П. Огарева, кандидат медицинских наук. Тел.: +7 (962) 596-06-13. E-mail: oleg-kulikov-84@mail.ru. ORCID: 0000-0003-4411-677X

Гуревич Константин Георгиевич – заведующий кафедрой ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни – залог успешного развития» Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова (МГМСУ), доктор медицинских наук, профессор. Тел.: +7 (495) 681-88-31. E-mail: kgurevich@mail.ru. ORCID: 0000-0002-7603-6064

Шляпкина Василиса Игоревна – лаборант лаборатории фармакокинетики НИМГУ им. Н.П. Огарева. Тел.: +7 (929) 745-01-58. E-mail: shlyapkina.98@mail.ru. ORCID: 0000-0002-5248-0136

Заборовский Андрей Владимирович – заведующий кафедрой фармакологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, доктор медицинских наук. Тел.: +7 (495) 650-45-14. E-mail: azabor@mail.ru. ORCID: 0000-0002-7923-9916

РЕЗЮМЕ

Введение. Одной из основных причин смерти в мире являются нарушения мозгового кровообращения (НМК). Заболевания данной группы часто приводят к лишению дееспособности, инвалидизации, ухудшению качества жизни и требуют длительного лечения и реабилитации. Перспективным направлением в лечении НМК является использование антиоксидантов, к которым относится, в том числе, препарат мелатонин. Ввиду доказанной эффективности мелатонина при НМК рационально создание его парентеральной формы для ускоренной его доставки в организм пациента, особенно в ситуациях, когда пероральное введение препарата невозможно. Липосомальная форма мелатонина позволяет вводить препарат внутривенно и, вероятно, будет способствовать прохождению мелатонина через гематоэнцефалический барьер.

Цель исследования – разработка методики получения липосомальной формы мелатонина для парентерального введения и исследование полученной лекарственной формы.

Материал и методы. Липосомы получали гидратированием липидной пленки, полученной на роторном испарителе из фосфолипидов и холестерина. Мелатонин включали в липидную оболочку, предварительно растворив его в хлороформе. Размер липосом измеряли методом динамического светорассеяния. Очистку липосом от невключившегося мелатонина проводили методом диализа через полупроницаемую мембрану. Эффективность включения мелатонина в липосомы определяли методом УФ-спектрофотометрии.

Результаты. Была получена липосомальная форма мелатонина с размером частиц $66,6 \pm 10$ нм. Концентрация лекарственного вещества в данном препарате составила $1,8 \pm 0,01$ мг/мл. Эффективность включения мелатонина в липосомы – $87,8 \pm 0,5\%$. Отношение включившегося мелатонина к фосфолипидам – 0,035.

Заключение. Полученные липосомы с мелатонином могут быть пригодны для внутривенного введения, и при наличии способности проникать через гематоэнцефалический барьер обеспечить адресную доставку высоких концентраций мелатонина в ЦНС, где он будет оказывать свое лечебное действие.

Ключевые слова: нарушение мозгового кровообращения, мелатонин, липосомы.

Для цитирования: Агеев В.П., Куликов О.А., Гуревич К.Г., Шляпкина В.И., Заборовский А.В. Разработка и анализ липосомальной формы мелатонина для внутривенного введения. Фармация, 2020; 69 (7): 29–33. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-07-05>

DESIGN AND ANALYSIS OF A LIPOSOMAL MELATONIN FORMULATION FOR INTRAVENOUS ADMINISTRATION

V.P. Ageev¹, O.A. Kulikov¹, K.G. Gurevich², V.I. Shlyapkina¹, A.V. Zaborovsky²

¹N.P. Ogarev National Research Mordovia State University, 68, Bolshevistskaya St., Saransk 430005, Russian Federation;

²A.I. Evdokinov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20, Delegatskaya St., Build. 1, Moscow 127473, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ageev Valentin Pavlovich – Engineer of the laboratory of pharmacokinetics of the National Research Mordovia State University (NRMSU). Tel.: +7 (927) 978-89-51. E-mail: valeageev@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-5152-5358

Kulikov Oleg Alexandrovich – Associated Professor of the Department of Pharmacology the NRMSU, PhD. Tel.: +7 (962) 596-06-13. E-mail: oleg-kulikov-84@mail.ru. ORCID: 0000-0003-4411-677X

Gurevich Konstantin Georgievich – Head of Department UNESCO of the Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Yevdokimov (MSUMD), Doctor of Medical Sciences, Professor. Tel.: +7 (495) 681-88-31. E-mail: kgurevich@mail.ru. ORCID: 0000-0002-7603-6064

Shlyapkina Vasilisa Igorevna – Laboratory assistant of the Pharmacokinetics laboratory of the NRMSU. Tel.: +7 (929) 745-01-58. E-mail: shlyapkina.98@mail.ru. ORCID: 0000-0002-5248-0136

Zaborovskiy Andrey Vladimirovich – Head of Department of Pharmacology of the MSUMD named after A.I. Yevdokimov, Doctor of Medical Sciences. Tel.: +7 (495) 650-45-14. E-mail: azabor@mail.ru. ORCID: 0000-0002-7923-9916

SUMMARY

Introduction. Cerebrovascular accident is one of the major causes of death worldwide. This group of diseases frequently leads to incapacity, disability, and a poor quality of life and requires long-term treatment and rehabilitation. The use of antioxidants that include melatonin among others is a promising treatment for cerebral circulatory disorders. In view of the proven efficacy of melatonin for these disorders, it is rational to design its parenteral formulation for accelerated drug delivery to the patient's body, especially in the situations where this drug cannot be administered orally. The liposomal formulation of melatonin allows its intravenous injection and is likely to promote its passage through the blood-brain barrier.

Objective: to develop a procedure to prepare a liposomal melatonin formulation for parenteral administration and to investigate the resulting dosage form.

Material and methods. Liposomes were obtained by hydration of the lipid film prepared from phospholipids and cholesterol, by using a rotary evaporator. Melatonin was incorporated into the lipid membrane, after dissolving the agent in chloroform. The size of liposomes was measured by dynamic light scattering. The liposomes were purified from unincorporated melatonin by dialysis through a semipermeable membrane. The efficiency of melatonin incorporation into the liposomes was determined using UV spectrophotometry.

Results. A liposomal melatonin formulation with a particle size of 66.6 ± 10 -nm was obtained. The drug concentration in this preparation was 1.8 ± 0.01 mg/ml. The efficiency of incorporating melatonin into liposomes was $87.8 \pm 0.5\%$. The ratio of the incorporated melatonin to phospholipids was 0.035.

Conclusion. The obtained liposomes with melatonin can be suitable for intravenous administration, and, if they can penetrate the blood-brain barrier, provide the targeted delivery of high-concentration melatonin to the central nervous system, where melatonin will exert its therapeutic effect.

Key words: cerebrovascular accident, melatonin, liposomes.

For reference: Ageev V.P., Kulikov O.A., Gurevich K.G., Shlyapkina V.I., Zaborovsky A.V. Design and analysis of a liposomal melatonin formulation for intravenous administration. *Farmatsiya*, 2020; 69 (7): 29–33. <https://doi.org/10/29296/25419218-2020-07-05>

Введение

Согласно данным ВОЗ, нарушения мозгового кровообращения (НМК) занимают 2-е место среди причин смерти в мире [1]. В целях оптимизации лечения таких заболеваний был проведен ряд исследований по изучению эффективности терапии с использованием мелатонина. Мелатонин – препарат, являющийся синтетическим аналогом гормона шишковидной железы. В связи с тем, что мелатонин ускоряет засыпание, уменьшает число ночных пробуждений, улучшает самочувствие после утреннего пробуждения, не вызывает ощущения вялости, разбитости и усталости при пробуждении, его применяют для нормализации циркадных ритмов [2].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* была доказана эффективность мелатонина при НМК [3]. Показано, что гормон обладает антиоксидантным и нейропротективным действием [4]. Также были

выявлены некоторые механизмы данных фармакологических эффектов. Так, редукцию неврологического дефицита у крыс мелатонин вызывал за счет влияния на специфические сигнальные медиаторы в ЦНС – киназу JAK2 и активатор транскрипции STAT3 [5]. В эксперименте на культуре клеток выявлена антиоксидантная активность мелатонина, кроме того, обнаружен противовоспалительный эффект. Мелатонин приводил к снижению малонового диальдегида в культуральной среде и цитоплазме клеток, повышению в клетках супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, при этом уменьшал содержание фактора некроза опухоли- α (ФНО α) и интерлейкина (ИЛ)-6. За счет схожих механизмов мелатонин снижал нейротоксичность веществ, используемых для моделирования болезни Паркинсона [6]. Учитывая эти данные, мелатонин может иметь перспективу использования для лечения и профилактики НМК и инсульта.

На данный момент существует только пероральная форма мелатонина, ввиду его крайне низкой растворимости в воде внутривенное введение данного препарата не является возможным. Эту проблему можно решить инкапсулированием лекарственного вещества в липосомы, что позволит вводить мелатонин внутривенно, ускорить наступление фармакологического эффекта и расширить спектр его применения.

Цель исследования – разработка методики получения липосомальной формы мелатонина для парентерального введения и исследование полученной лекарственной формы (определение размера полученных частиц, эффективности включения в них мелатонина и его концентрации в полученном растворе).

Материал и методы

Для получения липосомальной формы мелатонина применяли следующие материалы: лецитин (фосфатидилхолин) EPCS 10 8018-1/130, (Lipoid, Германия); холестерин (Avanti Polar Lipids Inc., США); хлороформ (трихлорметан) стабилизированный, х.ч. (Химмед, Россия); вода очищенная деионизированная, ФС 42-2619-98; мелатонин (N-Acetyl-5-methoxytryptamine) («ЛОРАС^{®1280}», США), натрия хлорид раствор для инфузий 0,9% флаконы 200 мл, («Биохимик», Россия).

В качестве оборудования для проведения экспериментов использовали: роторный испаритель Heidolph Laborotaeco (Германия); экструдер LIPEX[™] (Northern Lipids Inc., Канада); анализатор размеров наночастиц NANO-flex (Microtrac Inc., США); спектрофотометр UV-2600 (Shimadzu Inc., Япония); камера для ультрафильтрации модель 8200 (Amicon, США); диализный мешок MF-1210-76 с размером пор 12–14 кДа (MFPI, США); магнитная мешалка с подогревом C-MAGHS 7 (IKA, Германия), мембранный фильтр из поликарбоната, 0,40 мкм, (Sartorius, Германия).

Мелатонин включали в липидную оболочку, предварительно растворив его в хлороформе. Липосомы получали гидратированием липидной пленки, полученной на роторном испарителе. Размер липосом измеряли методом динамического светорассеяния. Очистку липосом от невключившегося мелатонина проводили методом диализа. Эффективность включения мелатонина в липосомы определяли методом УФ спектрофотометрии.

Результаты и обсуждение

Для включения мелатонина в липидную оболочку в 25 мл хлороформа растворяли 12 мг мела-

тонина. В полученный раствор добавляли 300 мг лецитина и 3 мг холестерина и перемешивали до полного растворения, смесь высушивали на роторном испарителе под вакуумом при температуре 55°C с постепенным увеличением скорости вращения с 60 до 180 об/мин. Выпаривание производили до образования тонкой ровной пленки и полного исчезновения запаха хлороформа, после чего пленку гидратировали 6 мл изотонического раствора натрия хлорида [7]. Для получения липосом одинакового размера дисперсионную смесь подвергали последовательному экструдированию с помощью поликарбонатных фильтров диаметром пор 400, 200 и 100 нм.

Для определения размеров липосомальных везикул 1 мл липосом помещали в пробирку Eppendorf и проводили анализ на аппарате NANO-flex с помощью программы Microtrac Flex 11.0.0.2 [6]. Размер полученных липосом составил 66,6±10 нм (рис. 1).

Очистку липосомальной дисперсии от не включившегося в липосомы мелатонина проводили с помощью диализа. В стакан для ультрафильтрации устанавливали диализную мембрану с диаметром пор 12–14 кДа, после чего в него помещали 5 мл раствора липосом и доводили его объем до 50 мл изотоническим раствором хлорида натрия. Стакан устанавливали на магнитную мешалку и с помощью баллона с азотом создавали в нем повышенное давление в 0,3 МПа. Диализ проводили в течение 24 ч при скорости мешалки 60 об/мин до образования в стакане густой очищенной дисперсии липосом объемом 3–4 мл, которую собирали и вновь доводили до объема 5 мл. Диализат объемом 45 мл, вышедший из стакана, собирали в колбу [8].

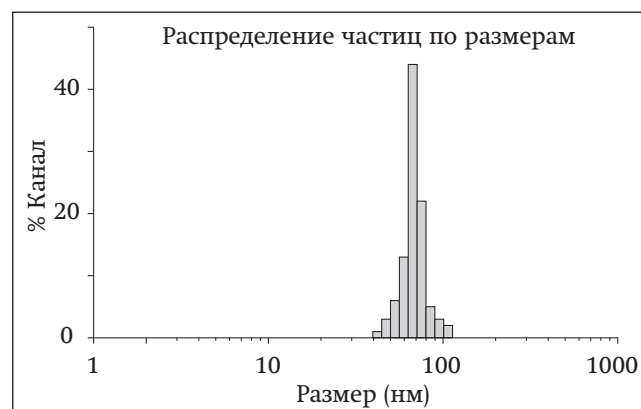


Рис. 1. Распределение липосом с мелатонином по размерам
Fig. 1. Size distribution of melatonin with liposomes

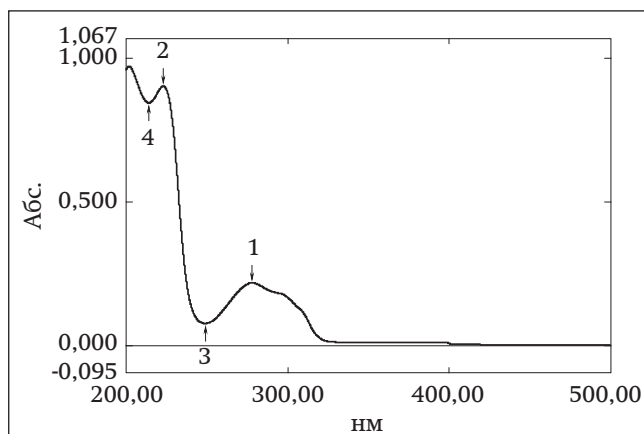


Рис. 2. Зависимость оптической плотности раствора мелатонина от длины волны
Fig. 2. Relationship between the optical density of melatonin solution and wavelength

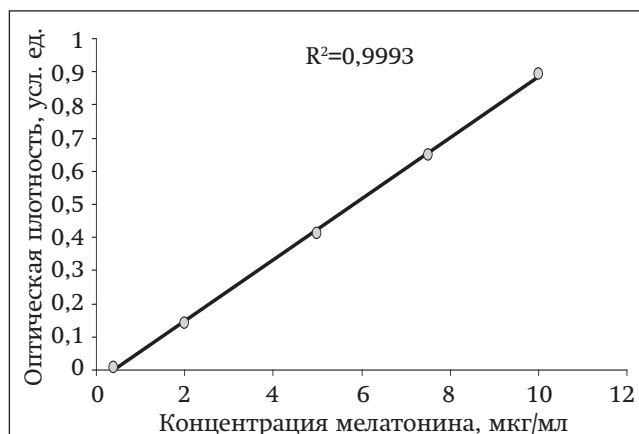


Рис. 3. Зависимость оптической плотности от концентрации мелатонина
Fig. 3. Relationship between melatonin optical density and concentration

Для определения эффективности включения мелатонина в липосомы использовали спектрофотометрию в УФ-области. Спектр раствора мелатонина снимали в растворе 95% этилового спирта. Для этого 25 мг субстанции мелатонина растворяли в 200 мл этилового спирта (раствор А). 1 мл раствора А помещали в колбу объемом 50 мл, добавляли 1 мл изотонического раствора хлорида натрия и доводили до метки 95% этиловым спиртом. Раствор сравнения готовили аналогичным образом, не добавляя при этом раствор А.

После тщательного перемешивания снимали спектр полученного раствора в диапазоне от 200 нм до 500 нм (рис. 2). Исходя из данных спектра, был сделан вывод, что максимум поглощения для мелатонина – 278 нм, что соответствует литературным данным.

Далее был построен график зависимости оптической плотности от концентрации. В исследованном диапазоне концентраций эта зависимость имела линейный характер ($R=0,999$) (рис. 3).

Чтобы определить эффективность включения мелатонина в липосомы проводили его количественное определение в диализате. Для этого 1 мл диализата помещали в мерную колбу объемом 50 мл и доводили до метки 95% этиловым спиртом (анализируемый раствор). У полученного раствора пятикратно измеряли оптическую плотность и рассчитывали среднее значение концентрации мелатонина (см. таблицу).

Полученное среднее значение использовали для определения количественных характеристик липосом. Первоначально находили массу мелатонина в диализате по формуле: $(C \times V_1 \times V_2) / V_3$; где

Результаты количественного определения содержания мелатонина в липосомах

Results of quantitative determination of melatonin levels in liposomes

№	C, мг/л	C _{ср} , мг/л	S	$\Delta X_{ср}$	X, мг	X _л , мг	C _л , мг/мл	E, %	F
1	0,54	0,54	0,019	0,0236	1,20±0,05	8,08±0,05	1,80±0,01	87,8±0,5	0,035
2	0,53								
3	0,53								
4	0,58								
5	0,53								

Примечание. C – концентрация мелатонина в диализате; C_{ср} – среднее; S – среднее квадратичное отклонение; $\Delta X_{ср}$ – доверительный интервал; X – количество мелатонина в диализате; X_л – количество мелатонина, оставшееся в липосомальной взвеси; C_л – концентрация мелатонина в липосомальной дисперсии; E – эффективность включения мелатонина в липосомы; F – отношение мелатонина к лецитину готовых липосом.

Note. C is the concentration of melatonin in the dialysate; C_{mean} is the mean; S is the root mean square deviation; ΔX_{mean} – confidence interval; X – the content of melatonin in the dialysate; X_l – the remaining content of melatonin in the liposomal suspension; C_l is the concentration of melatonin in the liposomal dispersion; E – the efficiency of incorporating melatonin into liposomes; F is the ratio of melatonin to lecithin of the finished liposomes.

V_1 – объем диализата (45 мл); V_2 – объем анализируемого раствора (50 мл); V_3 – объем диализата, взятый для анализа (1 мл). Зная изначальное количество мелатонина в 5 мл липосом до очистки диализом (10 мг), было рассчитано количество мелатонина, оставшееся в липосомах после очистки X_d (см. таблицу). Разделив это число на объем липосом, полученный в результате диализа (5 мл), была найдена концентрация мелатонина в липосомальной дисперсии C_d (см. таблицу). Учитывая изначальный объем липосом, полученный в результате гидратации липидной пленки 0,9% раствором хлорида натрия, находили эффективность включения мелатонина в липосомальные везикулы и отношение включившегося мелатонина к лецитину липосом Е, которая составила 87,8% (см. таблицу).

Заключение

Таким образом, описанный метод позволяет получать липосомы, содержащие мелатонин, размером $66,6 \pm 10$ нм, с высокой эффективностью включения (87,8%) и отношением лекарственной субстанции к основному липиду 0,035. По своим характеристикам полученные липосомы с мелатонином могут быть пригодны для внутривенного введения, и при наличии способности проникать через гематоэнцефалический барьер обеспечить адресную доставку высоких концентраций мелатонина в ЦНС, где он будет оказывать свое лечебное действие. Однако для подтверждения фармакологических свойств необходимы дальнейшие исследования на живых системах (культуре нервных клеток и лабораторных животных с моделью НМК).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

1. WHO fact sheet. The top 10 causes of death [Electronic resource]. Access mode: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. [Электронное издание]. Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2278.htm
3. Арушанян Э.Б. Защитная роль мелатонина при нарушениях мозгового кровообращения. Русский медицинский журнал. 2010; 8: 495–9.

4. Beni S.M., Kohen R., Reiter R.J. et al. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF- κ B and AP-1. *FASEB J.* 2004; 18: 149–51. DOI: 10.1096/fj.03-0323fje

5. Yang B., Zang L.E., Cui J.W. et al. Melatonin Plays a Protective Role by Regulating miR-26a-5p-NRSF and JAK2-STAT3 Pathway to Improve Autophagy, Inflammation and Oxidative Stress of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Drug Des. Devel. Ther.* 2020; 14: 3177–88. DOI: 10.2147/DDDT.S262121

6. Mack J.M., de Menezes Moura T., Bobinski F. et al. Neuroprotective effects of melatonin against neurotoxicity induced by intranasal sodium dimethyldithiocarbamate administration in mice. *Neurotoxicology.* 2020; 80: 144–54. DOI: 10.1016/j.neuro.2020.07.008

7. Куликов О.А., Агеев В.П., Инчина В.И. и др. Липосомальная лекарственная форма ацетилцистеина: получение и анализ. *Фармация.* 2016; 4: 23–5.

8. Куликов О.А., Пятаев Н.А., Заборовский А.В. и др. Разработка наносомальной формы аprotинина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2017; 6: 707–9.

References

1. WHO fact sheet. The top 10 causes of death [Electronic resource]. Access mode: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. [Electronic resource]. Access mode: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2278.htm (in Russian)
3. Arushanyan E.B. The protective role of melatonin in cerebrovascular accidents. *Russkiy medicinskiy zhurnal.* 2010; 8: 495–9 (in Russian)
4. Beni S.M., Kohen R., Reiter R.J. et al. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF- κ B and AP-1. *FASEB J.* 2004; 18: 149–51. DOI: 10.1096/fj.03-0323fje
5. Yang B., Zang L.E., Cui J.W. et al. Melatonin Plays a Protective Role by Regulating miR-26a-5p-NRSF and JAK2-STAT3 Pathway to Improve Autophagy, Inflammation and Oxidative Stress of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Drug Des. Devel. Ther.* 2020; 14: 3177–88. DOI: 10.2147/DDDT.S262121
6. Mack J.M., de Menezes Moura T., Bobinski F. et al. Neuroprotective effects of melatonin against neurotoxicity induced by intranasal sodium dimethyldithiocarbamate administration in mice. *Neurotoxicology.* 2020; 80: 144–54. DOI: 10.1016/j.neuro.2020.07.008
7. Kulikov O.A., Ageev V.P., Inchina V.I. et al. Liposomal form of acetylcysteine: development and analysis. *Farmatsiya.* 2016; 4: 23–5 (in Russian)
8. Kulikov O.A., Pyataev N.A., Zaborovskiy A.V. et al. Development of nanosomal form of aprotinin. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2017; 6: 707–9 (in Russian)

Поступила 5 августа 2020 г.

Received 5 August 2020

Принята к публикации 16 октября 2020 г.

Accepted 16 October 2020