



УДК 612.85:615.099:615.32-092.4

ХИТОЗАН ПОТЕНЦИРУЕТ ОТОТОКСИЧНОСТЬ АМИКАЦИНА В УСЛОВИЯХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АДЕКВАТНОЙ НАГРУЗКИ СЛУХОВОГО АНАЛИЗАТОРАА. А. Паневин¹, С. А. Иванов^{1,2}, П. В. Попрыдухин³, П. А. Андоскин¹, С. Г. Журавский^{1,2}**CHITOSAN POTENTIATES AMIKACIN OTOTOXICITY DURING ADEQUATE LOADING OF HEARING ANALYZER**

А. А. Panevin, S. A. Ivanov, P. V. Popryadukhin, P. A. Andoskin, S. G. Zhuravskiy

¹ ГБОУ ВОП «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

(Ректор – акад. РАМН, проф. С. Ф. Багненко)

² ФГБУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

(Директор – акад. РАМН, проф. Е. В. Шляхто)

³ ФГБУН «Институт высокомолекулярных соединений РАН», Санкт-Петербург, Россия

(Директор – член-корр. РАН, проф. Е. Ф. Панарий)

В эксперименте на крысах Wistar (массой 250–300 г) изучали степень угнетения амплитуды ПИ ОАЭ (в диапазоне 1–12 кГц) к концу первого и седьмого дня после однократного внутривенного введения амикацина (250 мг/кг) в условиях физиологически адекватной акустической нагрузки (экспозиция тона 2 кГц при интенсивности 100 дБ в течение 1 часа в свободном звуковом поле). Основой для парентерального введения применяли суспензию из нано- и субмикронных размеров частиц хитозана (со средним диаметром 340 нм) в физиологическом растворе ($3,3 \times 10^8$ сфер в 1 мл, что соответствовало при пересчете раствору хитозана с концентрацией 5 мкг/мл). В условиях акустической стимуляции введение амикацина на суспензии из частиц хитозана 7-му дню после инъекции статистически значимо выше (ANOVA, $p < 0,05$) угнетало амплитуду ПИ ОАЭ.

Ключевые слова: наночастицы хитозана, отодоступность, отопротекция, гематолабиринтный барьер, амикацин.

Библиография: 15 источников.

During experiments on 40 Wistar rats (weight 250–300 gr.) suppress grade of amplitude DP OAE (1000–12000 Hz) was studied on 1st and 7th days after amikacin (250 mg/kg) intravenous single injection. Amikacin was injected during persisting adequate acoustic loading (tone exposition 2000 Hz; tone intensivity 100 dB during 1 hour in free acoustic field). Nanoparticles of chitosan suspension (mild diameter 340 nm) were dissolved in 0.9% NaCl solution (number of chitosan nanospheres is 3.3×10^8 in 1 ml; and this number was equivalent to chitosan solution with substance concentration 5 mcg/ml) and this mixture was used as base for parenteral injection. We proved that on 7th day after injection of amikacin and chitosan suspension mixture during acoustic stimulation amplitude DP OAE was suppressed (ANOVA, $p < 0.05$).

Key words: nanoparticles of chitosan, drugs penetration in the inner ear, otoprotection, the blood-labyrinth barrier, amikacin.

Bibliography: 15 sources.

Центральная проблема фармакотерапии заболеваний внутреннего уха – наличие гематолабиринтного барьера (ГЛБ), непроницаемого для большинства ксенобиотиков [4]. Существующие фармакологические препараты, положительно влияющие на гомеостаз внутреннего уха, действуют опосредованно: либо путем нормализации нарушенного эндолимфатического давления, устраняя его гидропическое состояние (бетагистин [13]), либо путем консервации клеточных мембран элементов ГЛБ, повреждаемых в условиях гипоксических состояний (глюкокортикостероиды [7], антиоксиданты [9]).

Ставя перед собой задачу разработать механизм доступа лекарственных веществ к забарьерным тканям улитки – отодоступности, мы обратили внимание на возможности известного

природного полимера хитозана (Хз), активно исследуемого сегодня в качестве средства лекарственного переноса, основанного на принципах адресной (направленной, таргетной) доставки. Интерес к этому биосовместимому, биодергадируемому и априорно безопасному материалу вызван существующими экспериментальными сведениями о том, что Хз, как в форме раствора, так и преобразованный в нанообъекты, повышает биодоступность переносимых с его участием лекарственных веществ при пероральном [8], интраназальном [1], местном [14] и, главное, при парентральном [2] способах введения. При этом известно, что полимер, представленный в виде наночастиц, способен форсировать даже тканевые барьеры. А именно, показано свойство микромицелл из модифицированного Хз повышать



проницаемость гематоэнцефалического барьера для доксорубина [2].

Цель работы. Оценка способности хитозана, организованного в виде нано- и субмикронных частиц, влиять на кохлеарную доступность амикацина *in vivo*.

Материалы и методы. В работе использовано 40 крыс самцов, линии Wistar, с массой тела 250–300 г, соматически здоровых, с нормальной отоскопической картиной и показателями тимпанометрии. Выделенные с помощью рандомизации 8 групп животных (по 5 крыс в каждой), получали следующие внутривенные введения:

1 и 5-я группа (контрольные) – 1 мл физиологического раствора;

2 и 6-я группа – 1 мл суспензии нано- и субмикронных размеров частиц хитозана (ЧХз) на физиологическом растворе;

3 и 7-я группа – 250 мг/кг амикацина в 1 мл физиологического раствора;

4 и 8-я группа – 250 мг/кг амикацина в 1 мл суспензии нано- и субмикронных размеров ЧХз.

Хитозан, представленный в виде сферических форм частиц нано- и субмикронных размеров был получен из низкоконцентрированного раствора Хз методом осаждения раствором щелочи с последующей очисткой от посторонних примесей. Средний размер частиц определялся при сканирующей электронной микроскопии и составлял 340 нм (рис.). Для синтеза использовался Хз ММ = 80 кДа, степень деацетилирования 80%,

зольность 0,5%. Суспензию для введения получали смешиванием произведенного субстрата с физиологическим раствором, при этом в 1 мл содержалось около $3,3 \times 10^8$ частиц и при пересчете соответствовало раствору Хз с концентрацией 5 мкг/мл. Перед парентеральным введением суспензию стерилизовали ультрафиолетовым облучением в течение одного часа.

В 1, 2, 3, 4-й группах инъекции проводились в условиях относительного звукового покоя. В 5, 6, 7, 8-й группах – сразу после проведения функциональной нагрузки, в виде экспозиции акустического стимула подачей непрерывного тона 2 кГц с интенсивностью 100 дБ в течение 1 часа в свободном звуковом поле в помещении акустической камеры объемом 0,75 м³.

Функциональное состояние слухового анализатора характеризовали оценкой продукта искажения отоакустической эмиссии (ПИ ОАЭ) в диапазоне 1–12 кГц, на приборе «Нейро-Аудио», оснащенный программным обеспечением «Neuro-Audio.NET». Регистрация амплитуды ПИ ОАЭ проводилась трижды: за одни сутки до инъекции и спустя одни и семь суток после.

Все манипуляции с животными (исследования ПИ ОАЭ, внутривенные введения) выполнялись в условиях анестезии раствором тиопентала натрия 50 мг/кг внутрибрюшинно.

Значимость различий показателей амплитуды ПИ ОАЭ в каждой точке между экспериментальными группами оценивалась методом дис-

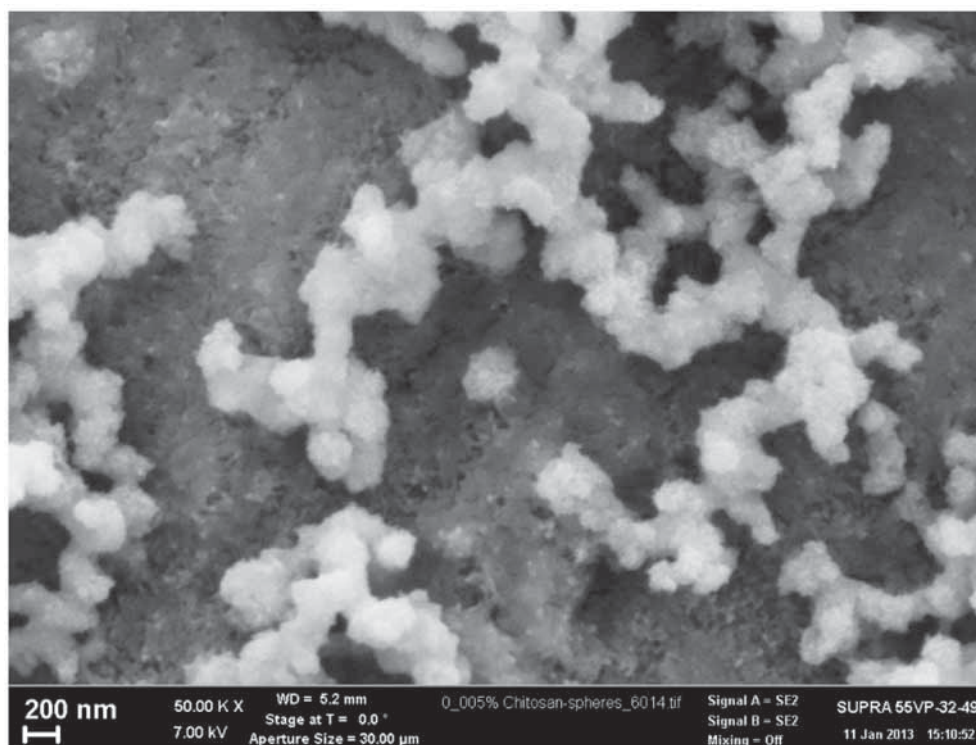


Рис. Электроннограмма. Изучаемые в качестве лекарственного переносчика субмикро- и наночастицы хитозана. Электронная сканирующая микроскопия. Supra-55 VP, Carl Zeiss. Ув. × 50 000.

персионного анализа для повторных измерений (ANOVA). Для статистической обработки данных применялся программный пакет SPSS 17.0. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Введение физиологического раствора как при акустической стимуляции так и без нее (группы 1 и 5) не сопровождалось статистически значимыми изменениями амплитуды ПИ ОАЭ ($p = 0,009$ и $p = 0,034$ соответственно; ANOVA), что указывает на отсутствие ототоксического эффекта выбранного акустического воздействия.

Введение суспензии ЧХз на физиологическом растворе не изменяло амплитуду ПИ ОАЭ как в условиях покоя (группа 2) ($p = 0,019$), так и после акустической стимуляции (группа 6) ($p = 0,030$). Результат указывает на отсутствие острой кохлеарной токсичности однократного внутривенного введения суспензии ЧХз.

Введение раствора амикацина в дозе 250 мг/кг угнетало амплитуду ПИ ОАЭ на всех исследуемых частотах, как в группе без функциональной нагрузки (группа 3) ($p = 0,012$), так и в группе с фоновой звуковой стимуляцией (группа 7) ($p = 0,040$), демонстрируя адекватность используемой дозы аминогликозидного антибиотика для задачи получения модели острого ототоксического повреждения. При этом в условиях покоя введение амикацина как на физиологическом растворе (группа 3), так и на суспензии из ЧХз (группа 4) угнетало амплитуду ПИ ОАЭ идентично ($p = 0,043$). В то же время, в группах с акустической нагрузкой смесь амикацина с суспензией ЧХз (группа 8) на 7-й день после введения приводила к статистически значимо большей степени депрессии амплитуды ПИ ОАЭ, чем при введении одного амикацина (группа 7) ($p = 0,004$).

Принято считать, что аминогликозидные антибиотики проникают в спиральный орган через механо-чувствительные каналы, расположенные на апикальной поверхности волосковых клеток и контактирующие только с эндолимфой [6; 10]. Степень угнетения амплитуды ПИ ОАЭ в этом случае определяется достигнутой концентрацией аминогликозида в рецепторном участке анализатора [15].

В эксперименте нами отмечено усугубление аминогликозидного повреждения при введении амикацина в суспензии из частиц хитозана около-наноразмерной величины и после предварительного проведения физиологически адекватного по природе для слухового анализатора раздражения. Именно фактор последнего позволяет думать, что феномен связан не столько с логично ожидаемым увеличением периода полувыведения препарата в результате замедления высвобождения амикацина с поверхности наносфер, а с развитием в самих тканях улитки некоего особенного состояния, способствующего повышенной проницаемости антибиотика.

Обсуждая механизм этой повышенной проницаемости, надо обратить внимание, что достаточно крупный размер изучаемых частиц (340 нм) исключает как процесс пассивной диффузии из кровеносного русла или перилимфатического пространства, так и проникновение через известные каналы щелевых контактов. Кроме того, сам полимер в жидких средах имеет положительный заряд, что создает дополнительное препятствие проникновению его частиц в эндолимфатическое пространство – жидкостную среду, имеющую крайне высокий положительный ионный потенциал [5]. Таким образом, с учетом приведенных физико-химических свойств и характеристик исследуемых ЧХз, предполагается, что их проникновение в спиральный орган может происходить путем активного эндоцитозного транспорта. Первостепенное участие в этом процессе Хз в виде именно нанообъектов подтверждает известное наблюдение о том, что переносчик из подобной же формы Хз повышал степень ототоксических эффектов неомицина при совместной аппликации на мембрану круглого окна медиальной стенки барабанной полости [14].

Другим условием для повышения проницаемости ГЛБ для амикацина явилась акустическая стимуляция в субтравматической интенсивности. В этом отношении известно, что при ряде внешних раздражителей (в частности, звуковом) отмечается неспецифическая реакция несенсорных эпителиальных элементов улитки в виде активизации свойственной им фагоцитарной активности [12]. Мы полагаем, что повышение интрацеллюлярного проникновения амикацина в зонах тканевых барьеров улитки может быть связано с интенсифицированным фагоцитированием субмикро-и наноразмерных ЧХз, переносящих на себе молекулы сорбированного аминогликозидного антибиотика. Такой процесс мог бы иметь место, как минимум, в двух тканевых образованиях перепончатой улитки. Во-первых, в эпителиоцитах сосудистой полоски, что приводило бы к увеличению концентрации амикацина в эндолимфе с последующим нарастанием его проникновения в волосковые клетки. Во-вторых, – в пуле поддерживающих эпителиоцитов, контактирующих своей апикальной поверхностью с волосковыми клетками, а базальной – с капиллярной сетью спиральных артериол. Резонно полагать вовлечение в этот процесс и перицитов кровеносных капилляров улитки [11], поскольку подобная активность присутствует у гистогенетически родственных к ним перицитов кровеносной капиллярной сети ткани головного мозга [3].

Таким образом, увеличение отодоступности низкомолекулярного ксенобиотика (амикацина), предположительно адсорбированного на поверхности сфер нано- и субмикронных размеров из природного полимера Хз, может объясняться ар-



тифициально стимулированным эндоцитозным (макрофагальным) трафиком в эпителиальных структурах ГЛБ. Главным заключением этого эксперимента становится то, что *in vivo*, в условиях практически сопоставимых с клиническими, показана возможность доставки лекарственных ве-

ществ к интракохлеарным структурам. Получение в эксперименте состояния отодоступности при «неспецифически повышенной проницаемости» ГЛБ становится первым шагом в реализации методик отопротекции, основанных на принципах адресной доставки.

Выводы

Суспензия из частиц хитозана нано- и субмикронных размеров на физиологическом растворе, применяемая в качестве парентерального носителя, потенцирует ототоксический эффект однократного введения амикацина ($p < 0,05$; ANOVA).

Физико-химические свойства изучаемых частиц хитозана предполагают активный эндоцитозный (макрофагальный) механизм их проникновения через гемато-лабиринтный барьер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bioavailability enhancement of verapamil HCl via intranasal chitosan microspheres / M. M. Abdel [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2013. – Vol. 51(C). – P. 59–66.
2. Brain-targeting study of stearic acid-grafted chitosan micelle drug-delivery system / Y. T. Xie [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2012. – Vol. 7. – P. 3235–3244.
3. Cellular mechanisms of CNS pericytes / H. K. Rucker [et al.] // *Brain. Res. Bull.* – 2000. – Vol. 51, N 5. – P. 363–369.
4. Drug delivery for treatment of inner ear disease: current state of knowledge / McCall A. A. [et al.] // *Ear. Hear.* – 2010. – Vol. 31, N 2. – P. 156–165.
5. Inner ear drug delivery for auditory applications / E. E. Swan [et al.] // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2008. – Vol. 60, N 15. – P. 1583–1599.
6. Li H., Steyger P. S. Systemic aminoglycosides are trafficked via endolymph into cochlear hair cells // *Sci. Rep.* – 2011. – Vol. 1, N 159. – P. 1–5.
7. Pharmacological influence on inner ear endothelial cells in relation to the pathogenesis of sensorineural hearing loss / B. Gloddek [et al.] // *Adv. Otorhinolaryngol.* – 2002. – Vol. 59. – P. 75–83.
8. Preparation, characterization, and *in vitro* and *in vivo* investigation of chitosan-coated poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for intestinal delivery of exendin-4 / M. Wang [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2013. – Vol. 8. – P. 1141–1154.
9. Reduced formation of oxidative stress biomarkers and migration of mononuclear phagocytes in the cochlea of chinchilla after antioxidant treatment in acute acoustic trauma / X. Du [et al.] // *Int. J. Otolaryngol.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 612–690.
10. The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels / W. Marcotti [et al.] // *J. Physiol.* – 2005. – Vol. 567, N 2. – P. 505–521.
11. The cochlear pericytes / X. Shi [et al.] // *Microcirculation.* – 2008. – Vol. 15, N 6. – P. 515–529.
12. The fate of outer hair cells after acoustic or ototoxic insults / K. A. Abrashkin [et al.] // *Hear Res.* – 2006. – Vol. 218, N 1–2. – P. 20–29.
13. The vascular mechanism of action of betahistine in the inner ear of the guinea pig / E. Laurikainen [et al.] // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* – 1998. – Vol. 255, N 3. – P. 19–23.
14. Use of the biodegradable polymer chitosan as a vehicle for applying drugs to the inner ear / A. Saber [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2010. – Vol. 39, N 1–3. – P. 110–115.
15. Warchol M.E. Cellular mechanisms of aminoglycoside ototoxicity // *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2010. – Vol. 18, N 5. – P. 454–458.

Паневин Алексей Александрович – оториноларинголог, аспирант лаборатории слуха и речи научно-исследовательского центра Первого Санкт-Петербургского ГМУ им. акад. И. П. Павлова. Россия. 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; тел.: 8-921-380-14-84, e-mail: aranevin86@mail.ru

Иванов Сергей Александрович – оториноларинголог, аспирант лаборатории слуха и речи научно-исследовательского центра Первого Санкт-Петербургского ГМУ им. акад. И. П. Павлова. Россия. 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; тел.: 8-911-824-70-46, e-mail: serjivanov84@gmail.com

Попрядухин Павел Васильевич – мл. н. с. лаборатории механики полимеров и композиционных материалов Института высокомолекулярных соединений РАН. Россия. 199004, Санкт-Петербург, Большой проспект В.О., д. 31; тел.: 8-905-273-20-98, e-mail: pavel-pn@mail.ru

Андоскин Павел Александрович – мл. н. с. отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий научно-исследовательского центра Первого Санкт-Петербургского ГМУ им. акад. И. П. Павлова. Россия. 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; тел. 8-950-035-66-02, e-mail: andoskinpavel@gmail.com

Журавский Сергей Григорьевич – докт. мед. наук, вед. н. с. лаборатории слуха и речи научно-исследовательского центра Первого Санкт-Петербургского ГМУ им. акад. И. П. Павлова. Россия. 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8; руководитель отдела экспериментальной патоморфологии Института экспериментальной медицины Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова. Россия. 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2, тел: 8-921-747-16-08; e-mail: s.jour@mail.ru