

Рентгенологическая оценка доставки порошкообразных веществ в бронхо-легочный аппарат лабораторной крысы методом «сухой» инсуффляции

М.А. Сырцова^{1,2}, С.В. Оковитый^{1,5}, В.Б. Бессонов³, М.В. Котова⁴

¹ – ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, Санкт-Петербург

² – ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

³ – Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург

⁴ – ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург

⁵ – НИЛ системного кровообращения Института экспериментальной медицины Северо-Западного федерального медицинского исследовательского центра МЗ РФ, Санкт-Петербург

Контактная информация: Сырцова Марина Александровна, marina.syrzcova@mail.ru

В исследовании впервые была опробована методика рентгенографической визуализации респираторного отдела аутбредных крыс путем введения контрастного вещества методом «сухой» инсуффляции. Использование этого метода позволяет доставлять порошкообразное вещество в бронхо-легочный аппарат крысы вплоть до сегментарных бронхов в полном объеме, равномерно распределяясь между правым и левым легкими. Введение бария сульфата (доставленная доза – 100 мг) методом «сухой» инсуффляции дает возможность рентгенологически визуализировать бронхо-легочный аппарат крысы.

Ключевые слова: «сухая» инсуффляция, рентгенографическая визуализация, легкие, крыса.

Введение

Современные способы доставки лекарственных средств непосредственно к органу-мишени являются наиболее оптимальными и широко востребованными. Наибольший прогресс достигнут в создании ингаляционных систем доставки препаратов в рамках лечения бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких [8]. Применение таких систем в пульмонологии сводит к минимуму системные побочные эффекты вводимых фармакологических агентов,

сокращает время от момента введения препарата до начала наступления фармакологического эффекта, позволяет точно контролировать отгруженную дозу лекарственного вещества. Кроме того, это дает возможность использовать минимально эффективную дозу препарата и уменьшить количество вспомогательных веществ, формирующих основу лекарственной формы, что ведет к снижению лекарственной нагрузки на организм и сокращению расходов при изготовлении лекарственного препарата [6].

При проведении доклинических исследований лекарственных препаратов для ингаляционного введения, а также при моделировании различных заболеваний бронхо-легочной системы у экспериментальных животных основной проблемой является сложность определения доставленной дозы фармакологического агента в легкие и глубины его проникновения. Одним из наиболее предпочтительных методов доставки в легкие мелких лабораторных животных порошкообразных веществ является использование «сухих» инсуффляторов [7]. Данное устройство представляет собой небольшую коническую трубку, состоящую из пластикового корпуса и стальной трубки. Корпус включает несколько частей: одна часть соединена со стальной трубкой (подающая трубка), средняя часть – расширение камеры для образца или субстанции. Далее следует камера для образцов, которая переходит в отделение с мини-насосом, где происходит прием и обработка воздуха (рис. 1). Качественные доклинические испытания с использованием инсуффляторов являются основной доказательной базой для проведения дальнейших клинических исследований.

Целью исследования стала оценка глубины проникновения порошкообразных веществ в бронхо-легочный аппарат лабораторной крысы при введении их методом «сухой» инсуффляции.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 12-ти беспородных белых крысах-самцах средней массой 320 г, полученных из питомника «Рапполово» РАМН. Содержание животных осуществлялось в условиях вивария на стандартном рационе со свободным доступом к воде при 12-часовом световом режиме в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом ФБОУ ВПО СПХФА. За 8 ч до проведения исследования животным ограничивался доступ к корму.

Для проведения инсуффляции животные наркотизировались с помощью комбинации тилетамина гидрохлорида/золазепама гидрохлорида (Золетил-100, Virbac, Франция) в дозе 4 мг/кг и ксилази-

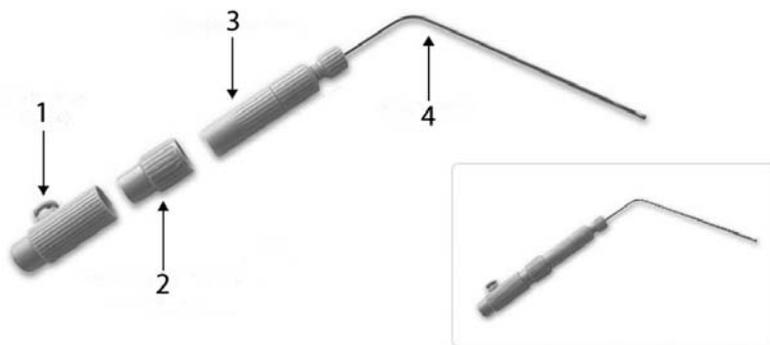


Рис. 1. Принципиальная схема устройства «сухого» инсуффлятора.

1 – мини-насос; 2 – расширение камеры для образца; 3 – камера для образцов; 4 – подающая трубка.

на гидрохлорида (Ксила 2%, Interchemie, Нидерланды) в дозе 10 мг/кг. Наркоз наступал через 3-4 мин после внутримышечного введения препаратов. После этого крыс фиксировали на специальной платформе, проводили интубацию трахеи с помощью ларингоскопа «Small Animal Laryngoscope for Rat» (Model LS-2-R, Penn-Century, США) и осуществляли инсуффляцию «сухим» инсуффлятором «Dry Powder Insufflator DP-4» (Penn-Century, США). Ранее возможность использования такого типа инсуффлятора для легочной доставки сухих порошковых веществ была показана в исследованиях на мелких лабораторных животных [5].

Для оценки глубины введения порошка в легкие было решено использовать наиболее доступный рентгенологический метод контроля с применением в качестве контраста бария сульфата (БАР-ВИПС, ООО «ВИПС-МЕД», Россия) в доставленной дозе 25, 50 и 100 мг (по 3 животных на точку). Контролем служили

оставшиеся животные, которым инсуффляционно вводилась лактоза, часто используемая в качестве вспомогательного вещества при изготовлении лекарственных форм, в доставленной дозе 25, 50 и 100 мг соответственно.

Рентгенографию выполняли на рентгеновском аппарате для ветеринарии «Пардус-300» (СПбГЭТУ «ЛЭТИ»), отличительной особенностью которого является сравнительно низкая мощность излучения и малые размеры фокусного пятна (менее 100 мкм) [3]. Снимки выполнялись при следующих физико-технических условиях: напряжение на трубке – 60 кВ; анодный ток – 150 мкА; время экспозиции – 0,1 сек. В качестве системы визуализации использовался автоматический сканер для пластин с фотостимулируемым люминофором. Время между снятием рентгенографических снимков составляло 3 мин. Для проведения рентгенографии было специально оборудовано рабочее место (рис. 2).

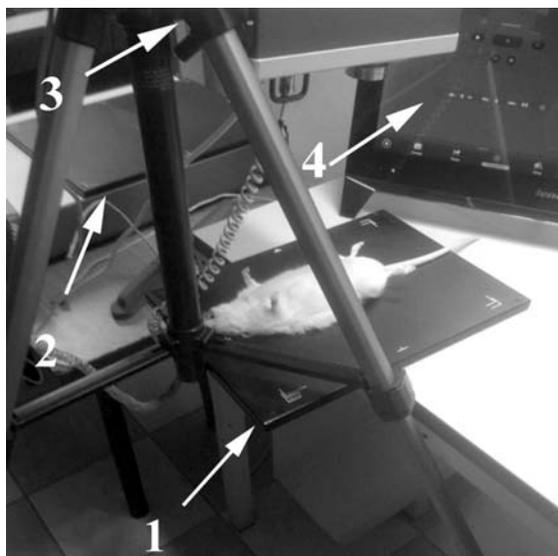


Рис. 2. Рабочее место для рентгенографического исследования.

1 – пластина для проведения рентгенографии; 2 – сканер; 3 – рентгеновский аппарат; 4 – ПК со специальным программным обеспечением для обработки получаемых изображений.

Результаты и их обсуждение

В результате эксперимента было установлено, что однократное введение в легкие крысы пропеллента (лактозы) не вызывает изменений в их рентгенологической картине по сравнению с нормой. Здоровые легкие практически не

задерживают рентгеновских лучей. Они дают светлый фон, на котором хорошо выделяются тени плотных органов грудной клетки. На снимке, выполненном в прямой проекции в фазу неполного вдоха (рис. 3А), легкие видны только в межреберьях, остальные участки прикры-

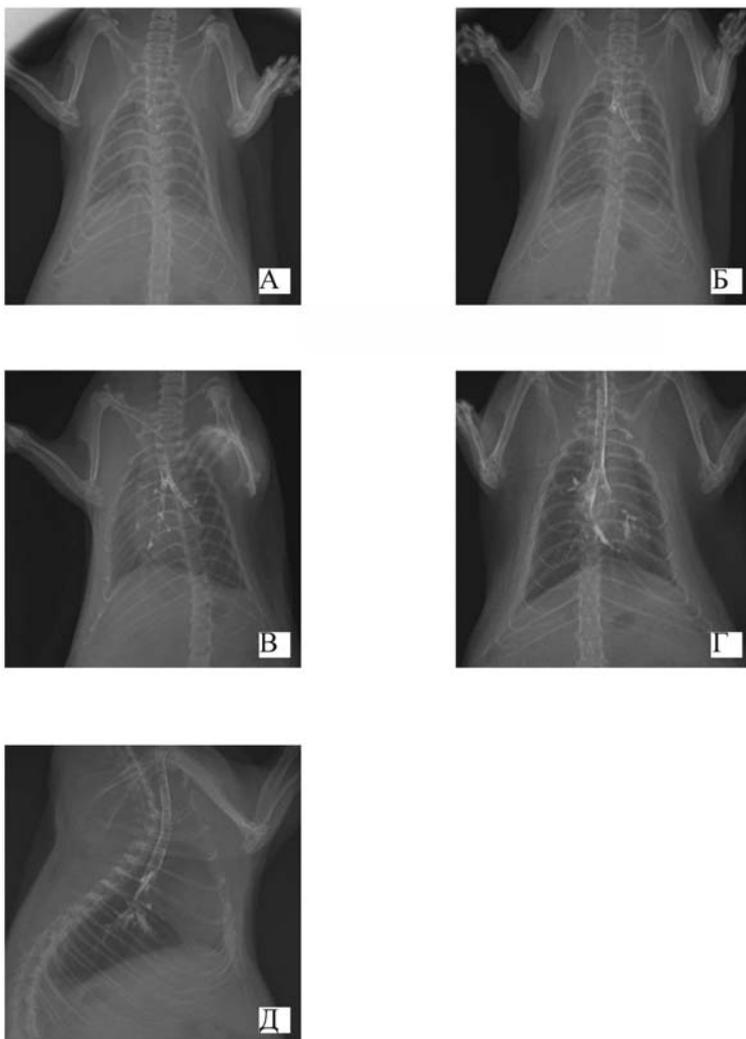


Рис. 3. Рентгенограммы грудной клетки.

А – рентгенограмма грудной клетки крысы контрольной группы после введения в легкие лактозы; Б – рентгенограмма грудной клетки крысы после введения в легкие бария сульфата (25 мг); В – рентгенограмма грудной клетки крысы после введения в легкие бария сульфата (55 мг); Г – рентгенограмма (прямая проекция) грудной клетки крысы после введения в легкие бария сульфата (100 мг); Д – рентгенограмма (правая боковая проекция) грудной клетки крысы после введения в легкие бария сульфата (100 мг).

ваются интенсивными тенями ребер, лопаток, плечевых костей, диафрагмы и сердечно-сосудистым силуэтом. Полученные результаты согласуются с описанием нормальных легких крысы [2].

После инсуффляции в легкие 25 мг бария сульфата на рентгенограмме органов грудной полости, выполненной в прямой проекции (рис. 3Б), в верхних отделах (до 5-6 ребра) обоих легочных полей наблюдали повышение прозрачности легочной ткани. В проекции бифуркации трахеи (больше справа – вероятно, вследствие задержки контраста в начальном отделе правого главного бронха) определялся высокоплотный очаг задержки контрастного вещества, визуализировалась однородная тень левого главного бронха. Направление тени косое, под углом $\sim 45^\circ$ по отношению к оси позвоночного столба, протяженностью от 4-го до 6-го ребра.

На рентгенограмме органов грудной полости, выполненной в левой косой проекции, после введения 55 мг контрастного препарата во всех видимых отделах обоих легочных полей (больше слева) отмечается повышение прозрачности легочной ткани (рис. 3В). В проекции трахеи, бифуркации, левого главного бронха, правого главного бронха и его каудального и поствального бронхов отмечаются неоднородные высокоплотные участки задержки контраста.

При введении контрастного вещества в дозе 100 мг на рентгенограммах органов грудной полости, выполненных в прямой (рис. 3Г) и правой боковой (рис. 3Д) проекциях, во всех видимых отделах обоих легочных полей отмечается повышение прозрачности легочной ткани. В проекции трахеи, бифуркации, левого и правого главных бронхов, кра-

ниального, каудального и поствального сегментарных бронхов правого легкого, двух крупных нижних сегментарных бронхов левого легкого отмечаются неоднородные высокоплотные участки задержки контрастного вещества.

Как показали проведенные исследования, по мере увеличения дозы вводимого контрастного вещества наблюдается увеличение глубины его проникновения в бронхо-легочный аппарат крысы, начиная от трахеи и заканчивая сегментарными бронхами.

Ранее эффект доставки лекарственного препарата в легкие с помощью метода «сухой» инсуффляции доказывали с помощью введения радиоактивных меченых частиц или флуоресцентных микросфер, смешанных с лактозой [4]. Как и в нашем исследовании, использование инсуффлятора позволяло увеличить глубину проникновения порошка и давало более равномерное его распределение в легких мышей. Такой метод введения фармакологических агентов может быть интересен как для оценки действия лекарственных веществ в бронхах, так и при моделировании различной бронхо-легочной патологии.

В табл. приведена сравнительная характеристика основных устройств по доставке субстанций в легкие лабораторных животных для проведения клинических исследований.

Кроме того, «сухая» инсуффляция может представлять интерес в качестве одного из методов бронхографии в ветеринарии, т.к. на сегодняшний день разработана только методика и техника интратрахеальной бронхографии крупных и средних бронхов у собак водной взвесью бария сульфата с предварительной анестезией дыхательных путей [1].

Преимущества и недостатки экспериментальных устройств доставки ингаляционных препаратов

Устройства для доставки ингалянта в легкие	Преимущества	Недостатки
Портативные системы ингаляционного введения с распределением ингалянта в гермообъеме	<ul style="list-style-type: none"> • Доступность; • Относительная дешевизна; • Портативность; • Возможно одновременное воздействие сразу несколько животных; • Не требуется наркотизация животных 	<ul style="list-style-type: none"> • Осаждение большого количества ингалянта вещества на поверхности тела животного; • Неэкономичность расхода ингалянта; • Большая потеря веществ при ингаляции; • Невозможность контроля доставленной дозы ингалянта в легкие; • Потеря вещества в атмосферу с возможностью воздействия ингалянта на экспериментатора; • Использование только жидких ингалянтов
Многофункциональные ингаляционные системы	<ul style="list-style-type: none"> • Применение для долгосрочных и краткосрочных исследований; • Возможно использование различных ингалянтов (жидких, пылевых, газообразные, наноаэрозоли); • Одновременное воздействие сразу несколько животных; • Не требуется наркотизация животных 	<ul style="list-style-type: none"> • Очень высокая стоимость; • Громоздкость; • Неэкономичность расхода ингалянта; • Большая потеря вещества при ингаляции; • Невозможность контроля доставленной дозы ингалянта в легкие
«Сухие» инсуффляторы	<ul style="list-style-type: none"> • Высокая портативность; • Быстрота выполнения «сухой» инсуффляции; • Введение ингалянта непосредственно в легкие; • Точный контроль доставленной, а не отгруженной дозы; • Экономичность 	<ul style="list-style-type: none"> • Необходимость наркотизации животных; • Использование только порошкообразных ингалянтов

Таким образом, методика «сухой» инсуффляции позволяет не только визуализировать бронхо-легочный аппарат крысы, но и равномерно распределить в нем вводимое вещество. Методика

проста в исполнении, легко воспроизводима в условиях лаборатории, не требует использования радиоактивных препаратов и дорогостоящего оборудования.

Выводы

1. Использование метода «сухой» инсуффляции позволяет доставлять порошкообразное вещество в бронхо-легочный аппарат крысы вплоть до сегментарных бронхов. Вводимые таким образом вещества попадают в орган-мишень в полном объеме, распределяясь равномерно между правым и левым легкими.

2. Введение бария сульфата (доставленная доза – 100 мг) методом «сухой» инсуффляции дает возможность рентгенологически визуализировать бронхо-легочный аппарат крысы.

Список литературы

1. *Липин В.А., Терехина М.Т., Хохлов А.Л.* Ветеринарная рентгенология. - М: Колос. 1966. 248 с.
2. *Петренко В.М.* Анатомия легких у белой крысы // Междунар. журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013. № 10. С. 414-417.
3. *Потрахов Н.Н., Грязнов А.Ю., Бессонов В.Б. и др.* Физико-технические основы современной микрофокусной рентгенодиагностики // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ». 2014. № 9. С.29-37.
4. *Burrows J.L., Douglas G.J., Smal H.* Visualization of dry-powder and liquid suspension deposition in rat lungs following intra-tracheal administration using a non-radioactive method // Pharmacokinetics & Drug Metabolism. - Sandwich: Pfizer Global R&D. 2006.
5. *Hoppentoch M., de Boer A.H.* In vitro evaluation of the DP-4M PennCentury™ insufflator // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2014. Vol. 88. No. 1. P. 153-159.
6. *Prokopovich P.* Inhaler devices: fundamentals, design and drug delivery // Woodhead Publishing Limited. 2013. 171 p.
7. *Sinha B., Mukherjee B.* Development of an inhalation chamber and a dry powder inhaler device for administration of pulmonary medication in animal model // Drug Dev. Ind. Pharm. 2012. Vol. 38. No. 2. P. 34-38.
8. Targeted drug delivery: Concepts and design / Ed. Devarajan P.V., Jain S. - Heidelberg, New-York, Dordrecht, London: Springer cham. 2015. P. 235-252.

Radiographic assessment delivery of powdery substances in broncho-pulmonary device of laboratory rat by “dry” insufflations

M.A. Syrtsova, S.V. Okovitiy, V.B. Bessonov, M.V. Kotova

In this research the technique of X-ray imaging of the respiratory department of outbred rats by administration of the contrast method “dry” insufflation was first tested. The usage of this method allows you to bring in a powdery substance in the broncho-pulmonary device rats up to the segmental bronchi fully, distributed evenly between the right and left lungs. The injection of barium sulphate (brought in dose of 100 mg) by the method of “dry” insufflation allows radiographic visualization of broncho-pulmonary device rats.

Key words: “dry” insufflation, radiographic imaging, lung, rat.