

Étude de faisabilité de la microdialyse des médicaments lipophiles

EMMANUELLE SANDRA TRE-BOLOU
Pharmacienne, Master.Sc., Ph.D.

Microdialyse (MD)

- La microdialyse est un outil efficace pour obtenir des échantillons sans protéines ou sans macromolécules à partir du fluide extracellulaire (ECF) des tissus
- Utilisé avec succès pour étudier la pharmacocinétique des médicaments dans des organes cibles tels que :
 - Muscle
 - Cerveau
 - Peau
 - ...autres

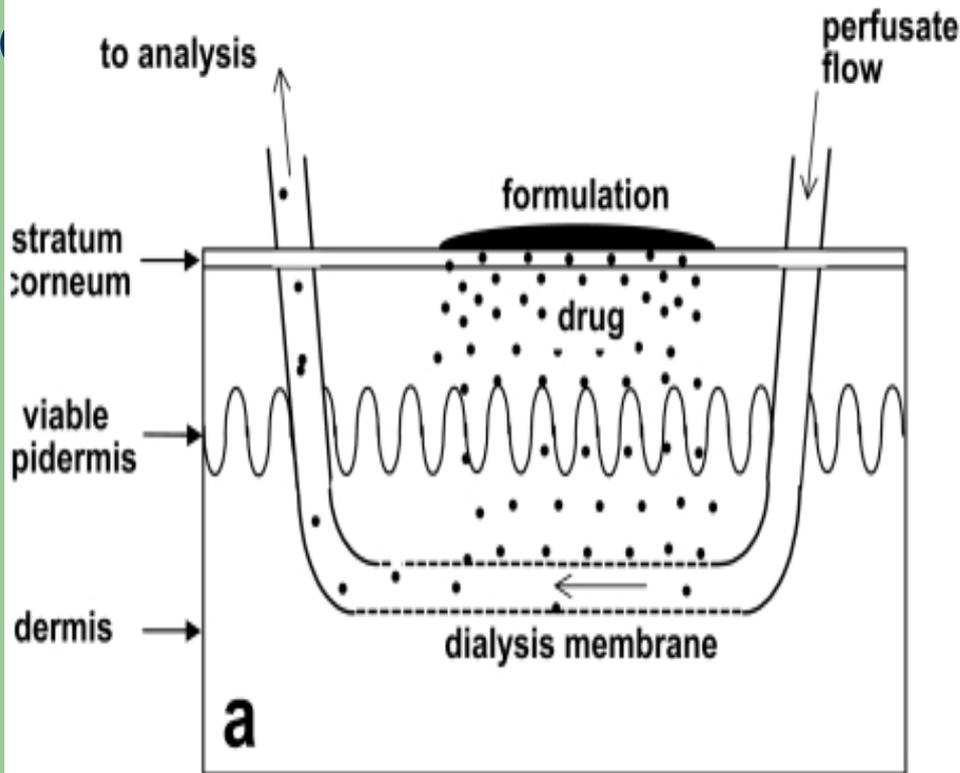
PLAN

- Décrire la technique de MD
- Discuter les limites des composés lipophiles
- Présenter les méthodes actuelles pour surmonter ces limites
- Perspectives d'avenir a propos de MD

Principe de Microdialyse

- La technique de microdialyse est basée sur la diffusion passive de substances le long de leurs gradients de concentration du fluide extracellulaire (ECF) vers le dialysat (le liquide de perfusion)
- La microdialyse est souvent effectuée dans des conditions de non-équilibre; seule une fraction de substance non liée dans l'espace extracellulaire est collectée

Exemple de microdialyse



- -Le Diagramme schématique de la membrane de microdialyse utilisée pour les expériences de pharmacocinétique cutanée
- -Une membrane de dialyse est située au milieu de la sonde et le flux de perfusate est unidirectionnel.
- -Le médicament entre par la membrane de dialyse semi-perméable

Microdialyse

- Le perfusat est en général une solution physiologique aqueuse correspondant étroitement à la composition ionique du **Liquide ExtraCellulaire (LEC)**.
- La sonde est perfusée en continu avec le perfusat. Le dialysat est alors la solution sortant de cette sonde qui est prélevée pour l'échantillonnage.
- **Seules les molécules capables de traverser la membrane se diffuseront en fonction du gradient de concentration.**
- **La membrane de MD permet la libre diffusion de petites molécules de soluté d'un poids moléculaire compris entre 5 et 30 kDa.**

Quelles sont ces molécules?

La loi de diffusion de Fick

L'échange de substances au niveau de la membrane semi-permeable a lieu en raison de la différence de concentrations (gradient de concentrations entre les deux milieux (LEC et perfusat dans la membrane) selon la deuxième loi de diffusion de Fick.

$$J = P \cdot S \cdot \Delta C$$

J est le flux du perfusat,

P est la perméabilité de la membrane de dialyse,

S est la surface spécifique de la membrane fibreuse de dialyse,

ΔC est la différence de concentration entre les deux milieux (LEC et perfusat dans la membrane) (gradient de concentrations)

Comme la diffusion à travers la membrane de MD suit la loi de Fick, les molécules de haut poids moléculaire ont tendance à avoir un coefficient de diffusion plus faible à travers la membrane de dialyse, ce qui entraîne une diminution de la récupération des molécules du médicament dans le dialysat.

La loi de diffusion de Fick

- $J = P \cdot S \cdot \Delta C$

Facteurs affectant le prélèvement des échantillons

La technique de MD dépend significativement de:

- Les caractéristiques physico-chimiques de la substance expérimentée
- le coefficient de partition (pKa)
- le débit de perfusion
- la température
- Il est clair que les médicaments peu solubles dans le perfusé seront difficiles à collecter via la membrane de dialyse
- La vitesse de diffusion du composé à travers le LEC qui entoure la membrane de microdialyse,
- La taille et composition de la membrane de microdialyse
- La solubilité des composés dans le perfusé hydrophile
- La liaison aux protéines de la substance étudiée
- la liaison non spécifique de substance concernée à la membrane et aux surfaces en plastique ou en verre utilisées pendant le processus analytique

Outils pour l'amélioration de la Microdialyse des médicaments lipophiles

- la lipo-microdialyse: une solution lipidique, typiquement une micro-emulsion isotonique, est perfusée à travers la sonde de MD.
- l'albumine ou la cyclodextrine: l'affinité ou la solubilité du médicament lipophile pour le perfusé peut être améliorée en ajoutant de l'albumine et des cyclodextrines ou tout autre composé ayant une certaine affinité de liaison pour le médicament.
- Jouer sur la taille et la composition de la membrane de la membrane semipermeable.
- Jouer sur le débit de perfusion du perfusé à travers la membrane de microdialyse,

Quelques definitions

- La Microdialyse nécessite l'introduction, dans le tissu, d'une sonde contenant une membrane semi-perméable à l'eau et aux petites molécules, au milieu, permettant le mouvement de molécules du médicament étudié par simple diffusion du milieu extracellulaire vers le dialysat.
- Le Perfusat
- Le Dialysat
- La Sonde
- La Membrane semi-permeable
- Le Gradient de concentrations

Lipo-microdialyse (lipo-MD)

- Un moyen d'améliorer le recueil d'échantillons du médicament serait d'utiliser un perfusé avec une meilleure affinité pour le composé.
- La lipo-microdialyse (Lipo-MD) est une nouvelle méthode de microdialyse utilisant une émulsion lipidique physiologique isotonique comme perfusé au lieu de la solution de Ringer, comme dans la MD conventionnelle.
- Elle a été conçue par Yuji Kurosaki et al. Ils ont comparé les prélèvements *in vivo* de la lipo-MD avec celle de la MD conventionnelle des alkylparabènes (APB) comme substance lipophile modèle,

L'amélioration du recueil des concentrations de médicament par lipo-MD est estimée par le ratio des concentrations recueillies par lipo-MD / les concentrations recueillies par MD conventionnelle

ALKYL PARABENS (APBs)	MOLECULAR WEIGHT (g/mol)	RATIOS (of the recovery values of LIPO-MD and MD)
Methyl Paraben (MPB)	152.15	2.03
Ethyl Paraben (EPB)	166.17	5.24
Propyl Paraben (PPB)	180.20	77.0
Butyl Paraben (BPB)	194.23	390.7

L'ensemble du système a fonctionné de manière satisfaisante.

Lipo-microdialyse (lipo-MD)

- Une étude similaire a été réalisée par Ward, Medina en utilisant deux émulsions lipidiques: Intralipid et Encapsin avec des résultats similaires.
- Cette amélioration est supposée provenir de l'augmentation significative de la diffusion des molécules d'APB dans le dialysat à travers la membrane de dialyse par l'utilisation d'une émulsion lipidique comme perfusat dans le cadre de la lipo-MD.
- Par conséquent, la lipo-MD est considérée comme un outil puissant pour les études de pharmacocinétique, fournissant des données pharmacocinétiques plus précises pour les substances lipophiles, y compris les substances de poids moléculaire relativement élevé.

Albumine

- Stahle et Carneheim ont effectué des études pour améliorer le recueil des concentrations de l'acide oléique par MD à l'aide de l'albumine.
- Une étude similaire a été réalisée par Sun et Stenken pour améliorer le recueil de concentrations des cytokines.
- Il a été observé qu'en utilisant l'albumine de sérum bovin (ASB), les concentrations ont presque doublé par rapport aux témoins.
- Dès que les cytokines diffusent à travers la membrane de la sonde, elles entrent en contact avec l'Albumine présent dans le perfusat et s'y lient automatiquement.

Albumine

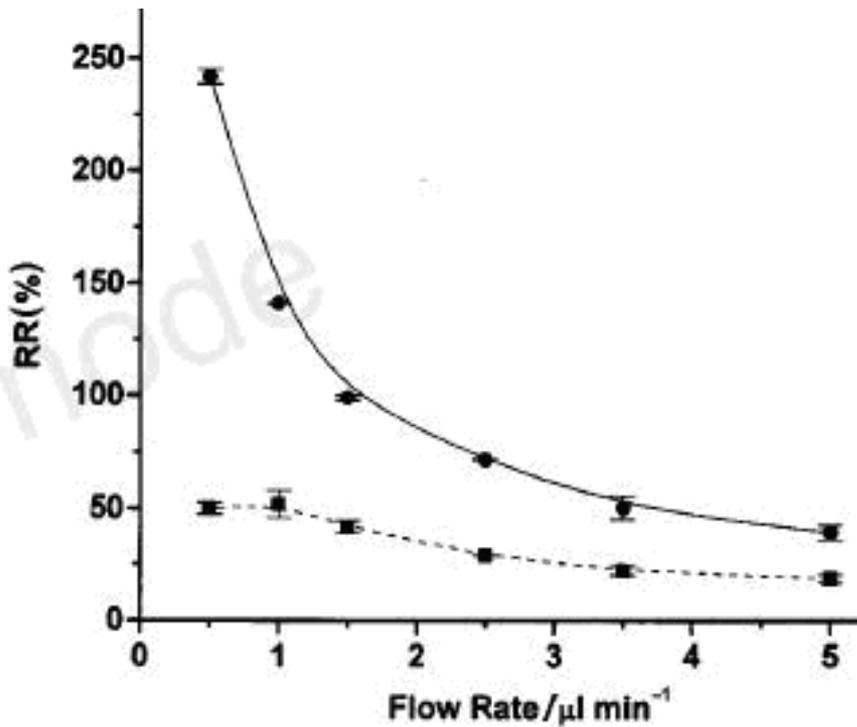
- En raison de la forte affinité de cette liaison, les cytokines seront piégées à l'intérieur de la membrane semi-perméable et seront emportées par le flux dans le dialysat.
- La présence de l'Albumine dans le perfusat a également augmenté le gradient de concentrations à l'intérieur de la membrane , augmentant la force motrice diffusives à travers la membrane, ce qui se traduira par une augmentation de quatre à douze fois les concentrations recueillies.
- Une étude similaire a été réalisée par Alexander N. et ses collègues pour améliorer les concentrations de désipramine à l'aide de l'albumine.

Inconvenient de l'Albumine

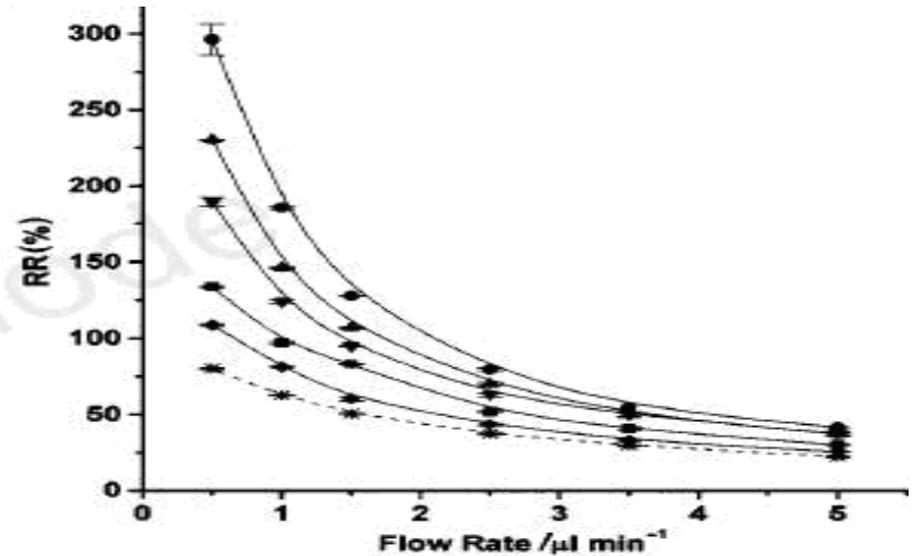
- La difficulté avec l'utilisation de l'Albumine est que nous ajoutons au dialysat ce que nous essayions à l'origine de supprimer, à savoir les grosses macromolécules.
- Par conséquent, il devient nécessaire d'extraire l'albumine des échantillons avant de les injecter dans la colonne pour l'évaluation HPLC.
- Les solutions médicamenteuses contenant l'albumine peuvent être traitées avec de l'acétonitrile, après collecte, pour précipiter l'albumine. Le surnageant est ensuite prélevé et injecté dans la colonne pour l'analyse HPLC.

Beta-Cyclodextrine

- La bêta-cyclodextrine (BCD) reste la cyclodextrine (CD) la plus efficace pour solubiliser et stabiliser les médicaments lipophiles à de faibles concentrations.
- La solubilité aqueuse relativement faible de la BCD limite son utilisation comme solubilisant .
- Alexander N. et ses collaborateurs ont montré l'augmentation des concentrations relatives de certains médicaments tricycliques hydrophobes: l'imipramine, la désipramine, l'amitriptyline, la carbamazépine et la prométhazine en incluant:
 - **Bêta-cyclodextrine (BCD) (0,5% p / v)**
 - **2-hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine (HP-beta-CD ou HP-BCD)** dans le perfusat pour former des complexes d'inclusion avec les médicaments, augmentant le flux d'analyte dans la membrane puis dans le dialysat.



- Fig. 4. This figure illustrates the enhancement of Imipramine RR in PBS 0.9% saline with different BCD concentrations in the perfusate (0% and 0.5% w/v BCD)



- Fig. 5. This figure illustrates the enhancement of Carbamazepine RR in PBS 0.9% saline with different BCD concentrations in the perfusate (0.1%, 0.2%, 0.5%, 1.0% & 2.0% w/v BCD)

Autres Facteurs

La taille de la membrane semi-permeable

- Afin d'améliorer le recueil des concentrations, la membrane semi-perméable doit avoir une porosité qui permet la diffusion de molécules plus grosses à travers elle.
- En effet, les membranes avec une plus grande porosité (300KDa) ont permis une amélioration de 30% des concentrations recueillies pour les interleukines.
- D'un autre côté, une porosité plus élevée des membranes permettrait à d'autres interférences présentes dans la matrice extracellulaire de passer à travers la membrane, résultant en un échantillon sale, qui nécessiterait une certaine préparation avant l'analyse HPLC.

Autres Facteurs

La composition de la sonde

- Une augmentation significative des concentrations des médicaments étudiés a été observée à l'aide d'une membrane en polycarbonate-polyéther (PC) .
- La membrane PC a donné des valeurs améliorées qui étaient deux fois supérieures à celles des membranes en cuprophane ou AN-69.

Le débit de perfusion

- La diminution du débit de perfusion de microdialyse entraîne une augmentation des concentrations recueillies.

Autres Facteurs

La liaison des composés à la sonde et à la membrane semi-perméable

- Ce phénomène a été observé pour le neuropeptide Y (NPY). La concentration de NPY dans le dialysat s'est révélée très faible, inférieure à 2%, en raison de la liaison du peptide à la membrane semi-perméable.
- Cependant, en ajoutant 0,5% d'albumine sérique humaine au perfusat, il a été possible d'augmenter la concentration de NPY dans le dialysat jusqu'à 13 à 16% .

Merci de votre attention



Questions

