

ЕҢБЕК ҚЫЗЫЛ ТУ ОРДЕНДІ
«Ә. Б. БЕКТҰРОВ АТЫНДАҒЫ
ХИМИЯ ҒЫЛЫМДАРЫ ИНСТИТУТЫ»
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ

ҚАЗАҚСТАННЫҢ ХИМИЯ ЖУРНАЛЫ

ХИМИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ КАЗАХСТАНА

CHEMICAL JOURNAL of KAZAKHSTAN

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
«ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКИХ НАУК
им. А. Б. БЕКТУРОВА»

1 (61)

ЯНВАРЬ – МАРТ 2018 г.
ИЗДАЕТСЯ С ОКТЯБРЯ 2003 ГОДА
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

АЛМАТЫ
2018

Л. Ж. ЖАПАРОВА, М. Ж. БУРКЕЕВ,
Е. М. ТАЖБАЕВ, Т. С. ЖУМАГАЛИЕВА

Карагандинский государственный университет им. Е. А. Букетова,
Караганда, Республика Казахстан

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ АЛЬБУМИНА, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТОМ «П-АМИНОСАЛИЦИЛОВАЯ КИСЛОТА»

Аннотация. Приведены результаты исследования наночастиц (НЧ) серного альбумина, иммобилизованных противотуберкулезным препаратом «п-аминосалициловая кислота» (ПАСК). Введение лекарства в матрицу полимера проведено двумя способами: адсорбцией лекарства на пустых наночастицах альбумина и включением ПАСК в наночастицы в процессе сшивки макромолекул альбумина. Получены НЧ альбумина с удовлетворительными физико-химическими характеристиками и достаточно высоким содержанием лекарства. Изучен процесс высвобождения лекарственного вещества из полимерных наночастиц серного альбумина. Степень высвобождения лекарственного препарата имеет высокие значения и составляет 88 и 80 % в случаях адсорбции и включения соответственно. Таким образом, полученные результаты позволяют надеяться на пролонгацию действия п-аминосалициловой кислоты и снижение разовой дозы лекарства при терапии туберкулеза.

Ключевые слова: полимерные наночастицы, альбумин, противотуберкулезный препарат, п-аминосалициловая кислота, адсорбция, включение.

В настоящее время лечение такого заболевания, как туберкулез остается одной из главных проблем современной медицины. Туберкулез сегодня широко распространен в странах Африки и Азии и по статистическим данным приводит к смертности каждого третьего инфицированного в мире [1, 2]. Интенсивное лечение этого заболевания с применением высоких доз лекарств оказывает сильное токсическое действие, а неоднократное введение препарата в течение дня вызывает неудобство у пациентов. К тому же, использование сильнодействующих антибиотиков в комплексе приводит к проявлению множественной лекарственной устойчивости. В связи с этим, проблема создания терапевтической системы, позволяющей осуществить направленный транспорт лекарства в место назначения в заданные сроки, особенно важна в химиотерапии туберкулеза. Одним из лекарственных препаратов, используемых в терапии туберкулеза, является *n*-аминосалициловая кислота (ПАСК) (рисунок 1), несмотря на то, что это лекарство само по себе является препаратом умеренного действия, т. е. относится ко II ряду, ПАСК с ее натриевой солью широко используется как в моно-, так и в комплексной терапии и является одним из первых антибиотиков, применяемых в лечении туберкулеза. Препарат обладает бактериостатическим действием только против туберкулезных бактерий.

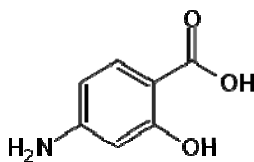


Рисунок 1 – Структурная формула ПАСК

Как и при применении других химиотерапевтических препаратов, в процессе лечения ПАСК образуются лекарственно-устойчивые формы бактерий. Кроме того, период полувыведения данного лекарственного препарата составляет всего 45-60 мин, что обуславливает необходимость назначения его по 5-12 г в сутки, а иногда и более высокие дозы. Разработка новых форм для транспорта противотуберкулезного препарата ПАСК в виде полимерных НЧ позволит обеспечить пролонгированное высвобождение лекарства с поддержанием эффективной концентрации лекарственного вещества (ЛВ) в крови в течение заданного промежутка времени, снизить побочные действия лекарственного препарата, таким образом повышая его терапевтический эффект.

Из литературных источников известно, что НЧ получают как из природных (альбумин, желатин, декстран и др.), так и из синтетических (полиметилметакрилат, полистирол, полиалкилцианоакрилат и др.) полимеров [3]. Сывороточный альбумин является одним из перспективных и широко используемых биополимеров для получения НЧ, который уже зарекомендовал себя в качестве полимерного носителя для многих лекарственных препаратов. В работе [4] показано, что альбумин аккумулируется в зараженных тканях, а НЧ, полученные на основе альбумина, не токсичны и хорошо переносятся человеческим организмом. Наличие в структуре альбумина множества реакционноспособных центров (тиоловые, имидазольные, карбоксильные и аминогруппы) дает возможность связывания его молекул бифункциональным соединением – глутаровым альдегидом. В частности, возможно сшивание по аминным связям с образованием иминов. Кроме того, функциональные группы (карбоксильные и аминные), присутствующие в структуре альбумина, позволяют модифицировать поверхность НЧ, прикрепляя «узнающие» (направляющие) молекулы, что позволит обеспечить целенаправленную доставку лекарства [5, 6]. В связи с этим, с целью повышения терапевтического эффекта противотуберкулезного препарата ПАСК нами исследована возможность связывания данного лекарства с НЧ сывороточным альбумином.

Пустые НЧ альбумина синтезировали методом десольвации, описанным ранее учеными университета им. Й. Гете [5-7]. Суть данного метода заключается в следующем: растворенный в воде сывороточный альбумин подвергают десольвации этанолом с последующей стабилизацией частиц; затем макромолекулы альбумина сшивают глутаровым альдегидом.

Синтез НЧ осуществляли при температуре 25 °С. Скорость подачи десольватирующего агента (этанола) в среду регулировали с помощью минасоса, значение рН поддерживали в пределах 8,0-8,5 [8]. От непрореагировавшего сывороточного альбумина раствор очищали трехкратной промывкой водой и последующим центрифугированием в течение 15 мин при 14500 об/мин на приборе Eppendorf 14500 Miniplus (Германия). Физико-химические характеристики полученных пустых НЧ альбумина определяли фотонной корреляционной спектроскопией, данные которого приведены на рисунке 2.

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 108,4	Peak 1: 117,2	91,9	53,24
Pdl: 0,273	Peak 2: 3533	8,1	1223
Intercept: 0,639	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality: Good			

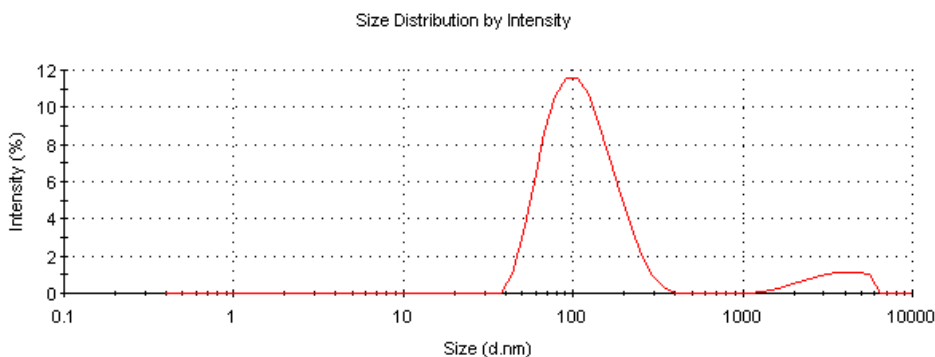


Рисунок 2 – Размер пустых НЧ серного альбумина

Из рисунка 2 видно, что синтезированные частицы имеют малый размер (108,4 нм) и достаточно узкое распределение (PDI = 0,273), а доля частиц нанометрического размера составляет практически 92 %, что удовлетворяет требованиям полимерных носителей лекарственных препаратов.

В продолжение исследования нами рассмотрена возможность связывания НЧ альбумина с противотуберкулезным препаратом ПАСК методом адсорбции. Адсорбцию ЛВ на НЧ сывороточного альбумина осуществляли в две стадии: получение пустых НЧ и последующее связывание их с ПАСК. Связывание *n*-аминосалициловой кислоты с пустыми НЧ проводили непосредственным смешением соответствующих растворов при перемешивании (650 об/мин) при температуре 25 °С. При этом концентрацию лекарства в растворе варьировали в пределах 0,02-0,1 г/мл. Данные о физико-химических характеристиках частиц после сорбции ПАСК разных концентраций на НЧ альбумина сведены в таблицу 1.

Таблица 1 – Характеристики НЧ сывороточного альбумина, иммобилизованных ПАСК методом адсорбции

Концентрация ПАСК, г/мл	Характеристики НЧ			
	Средний диаметр частиц, нм	Поли-дисперсность	Выход частиц с размером до 1000 нм, %	Степень связывания, %
0,02	758,6	0,184	100,0	10,0
0,04	512,0	0,165	100,0	23,4
0,06	635,2	0,201	97,7	12,0
0,08	670,4	0,246	100,0	36,5
0,1	998,4	0,196	100,0	14,7

По результатам, приведенным в таблице 1, видно, что размер частиц значительно увеличился после адсорбции ПАСК на пустых НЧ альбумина, значение полидисперсности варьирует в пределах 0,165-0,246, что указывает на достаточно узкое распределение частиц по размерам.

Следующим этапом работы было определение степени связывания лекарства с НЧ альбумина, для чего полученные частицы отделяли от маточного раствора ультрацентрифугированием при 14500 об/мин и промывали водой. Содержание несвязавшегося лекарства определяли кондуктометрическим методом, результаты которого также приведены в таблице 1. Как видно, наиболее высокой степени связывания можно достичь при использовании концентрации лекарства 0,08 г/мл. Учитывая также относительно малый размер и значение степени связывания, которое превышает 20 % при адсорбции 0,4 г ЛВ, нами для дальнейших исследований выбраны НЧ с адсорбированным ПАСК концентрациями 0,04 и 0,08 г/мл.

Немаловажным фактором применимости полимер-иммобилизованных форм лекарственных препаратов является возможность биодegradации полимера с высвобождением ЛВ. Известно, что высвобождение лекарства из полимерных микро- и наночастиц может происходить посредством десорбции лекарства, находящегося на поверхности полимера и/или диффузии ЛВ в результате эрозии полимерной матрицы. Поэтому в продолжение исследований нами изучена кинетика высвобождения ПАСК из матрицы полимерных НЧ альбумина. Скорость высвобождения лекарства из НЧ альбумина изучали в *in vitro* условиях (рН 7,4, температура 37⁰С) в течение 24 ч. Сравнительные данные по степени высвобождения ПАСК при адсорбции 0,4 и 0,8 г лекарства приведены на рисунке 3.

Из графика зависимости количества высвободившегося ПАСК от концентрации лекарства видно, что выделение лекарства в среду из НЧ, иммобилизованных 0,4 г ПАСК, происходит быстрее по сравнению с высвобождением лекарства из полимерных НЧ, иммобилизованных 0,8 г ПАСК. В целом, как и следовало ожидать, в обоих случаях скорость процесса высвобождения достаточно высокая на начальном этапе: так, при адсорбции

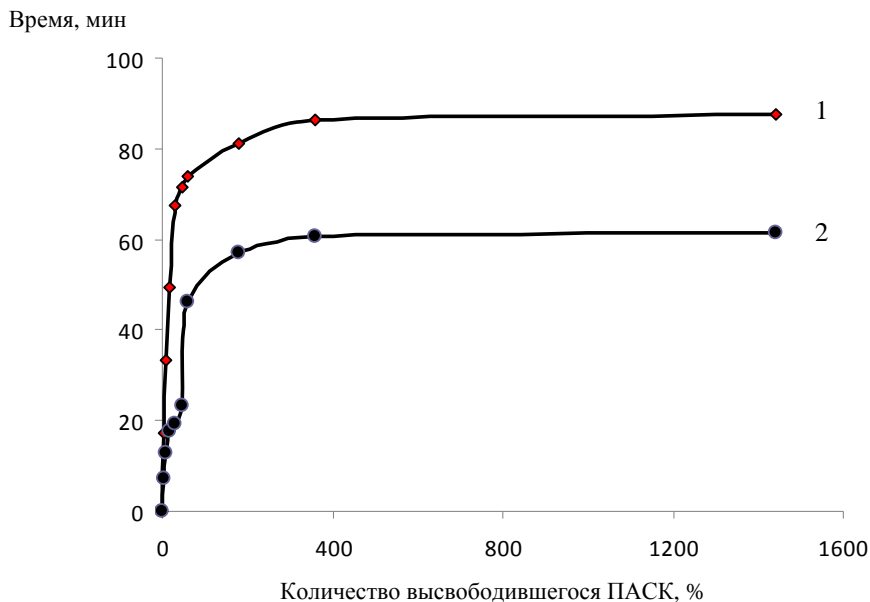


Рисунок 3 – Зависимость количества высвободившегося лекарства из матрицы НЧ сывороточного альбумина, иммобилизованных 0,4 (1) и 0,8 г (2) ПАСК, от времени

0,4 г лекарства в течение первых 10 мин в среду выделяется около 30 % ПАСК, а через 30 мин – более 60 % ЛВ.

Однако далее высвобождение лекарства идет медленнее с выделением около 80 % лекарства за 3 ч, а через сутки количество высвободившегося ЛВ составило 88 %. Высвобождения оставшегося количества ПАСК в модельную среду не наблюдалось, что, по-видимому, связано со сшитой структурой макромолекул альбумина.

Несмотря на общее сходство характера высвобождения ПАСК из НЧ альбумина с 0,8 г лекарства, выделение ЛВ в среду в этом случае проходит медленнее: так, за 10 мин высвободилось только 13 % лекарственного вещества, а за 30 мин – только 19% ; за час выделилось 46 % ПАСК, а через 3 ч количество выделившегося лекарства достигло 57 %. Однако максимально высвободившееся количество ЛВ за сутки составило только 62 %.

Быстрое высвобождение основного количества лекарства в среду в начале процесса можно объяснить выделением адсорбированного ПАСК, главным образом, с поверхности НЧ. Дальнейшее высвобождение происходит, по всей видимости, за счет выделения ЛВ из внутренней части НЧ в результате их частичной деструкции.

При адсорбции существует риск потери некоторого количества лекарства десорбцией с поверхности частиц, в связи с этим, на следующем этапе нами исследовано присоединение лекарства в процессе получения частиц. В этом случае ПАСК предварительно растворяли в водном растворе альбумина, затем проводили десольвацию. Концентрацию лекарства в

исходном растворе поддерживали как и в случае адсорбции (0,02-0,1 г/мл). Физико-химические характеристики частиц, полученных включением ПАСК, показаны в таблице 2.

По данным фотонной электронной спектроскопии можно увидеть (таблица 2), что наилучшие результаты получены при иммобилизации 1 г лекарства: средний диаметр частиц составил 211,5 нм, а значение полидисперсности (0,524) указывает на достаточно узкое распределение частиц по размерам. Кроме того, из таблицы также видно, что 86 % системы составляют частицы нанометрического размера.

Степень связывания ПАСК с НЧ альбумина, полученных методом включения, определяли по значениям электропроводности, которые также показаны в таблице 2. Можно сделать вывод о том, что иммобилизация 1 г лекарства в матрицу сывороточного альбумина позволяет связать до 38 % ПАСК, что является достаточно высоким показателем. Также в этом случае были получены НЧ с удовлетворительными физико-химическими характеристиками, поэтому нами изучена кинетика высвобождения лекарственного вещества из полимерных НЧ альбумина, полученных включением 1 г ПАСК.

Таблица 2 – Характеристики НЧ сывороточного альбумина, иммобилизованных ПАСК методом включения

Концентрация ПАСК, г/мл	Характеристики НЧ			
	Средний диаметр частиц, нм	Полидисперсность	Выход частиц с размерами до 1000 нм, %	Степень связывания, %
0,02	1332,0	0,402	100	11,9
0,04	2022,0	0,467	0	18,7
0,06	2330,0	1,0	0	20,6
0,08	1684,0	0,409	5,5	21,8
0,1	211,5	0,524	86,8	38,2

Скорость высвобождения лекарства из матрицы НЧ альбумина изучали в условиях, моделирующих биологические (рН 7,4, температура 37⁰С), а количество выделившегося в среду лекарства также определяли кондуктометрическим методом. График зависимости количества высвободившегося ПАСК от времени показан на рисунке 4.

Из приведенного графика видно, что высвобождение ПАСК из НЧ альбумина, иммобилизованных методом включения, относительно медленная: так, за первые 15 мин в среду выделяется только около 8 % лекарства, и еще через 15 мин – 25 %, а за час – всего 32 % ПАСК. Далее менее 50 % связанного лекарства высвобождается за 3 ч.

Следует отметить, что период полувыведения самого лекарства составляет 45-60 мин, что позволяет сделать вывод о перспективности иммобилизации противотуберкулезного препарата ПАСК в матрицу НЧ сыворо-

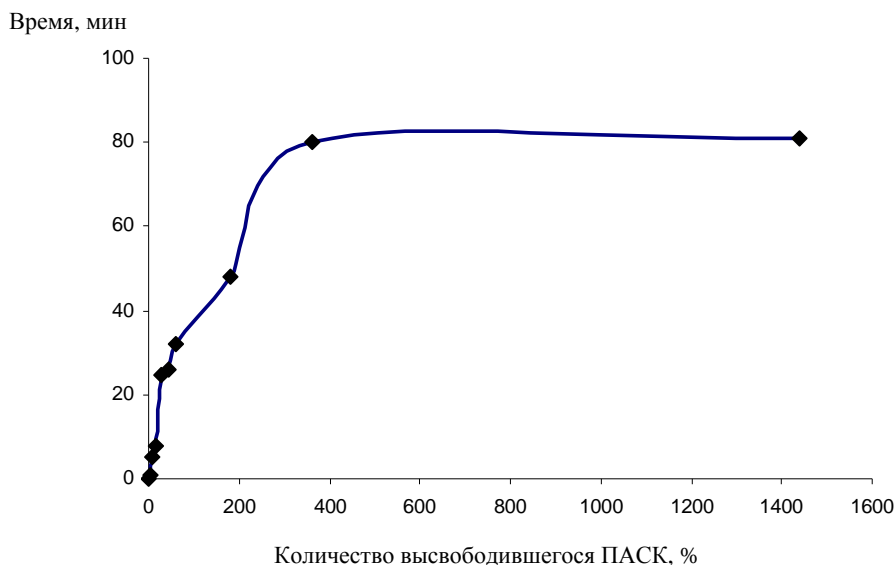


Рисунок 4 – Зависимость количества высвободившегося ПАСК из матрицы НЧ сывороточного альбумина, иммобилизованных 1,0 г лекарства, от времени

точного альбумина методом включения, при этом концентрацию лекарства можно еще значительно повысить для того, чтобы добиться необходимого терапевтического эффекта. Как видно из рисунка 4, высвобождение лекарства прекращается по достижении 80 %; оставшаяся часть ПАСК, по-видимому, не выделяется из матрицы альбумина из-за сшитой структуры НЧ.

Таким образом, в настоящей работе получены НЧ сывороточного альбумина, иммобилизованные противотуберкулезным препаратом ПАСК двумя способами: адсорбцией лекарства на пустых НЧ альбумина и растворением ПАСК в среде непосредственно в процессе сшивки макромолекул альбумина. По результатам исследований можно заключить, что полученные методом включения НЧ имеют удовлетворительные характеристики и дают возможность пролонгации действия лекарства до 3-х раз, что может быть использовано в дальнейшем для транспорта противотуберкулезного препарата ПАСК.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Du Toit L.C., Pillay V., Danckwerts M.P. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches: Review // *Respiratory Research*. – 2006. – 7. – 118. – P. 1-18.
- [2] Буй К.Т., Аляутдин Р.Н. Поли(лактидные) наночастицы с сорбированными противотуберкулезными средствами // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2008. – 3. – С. 7-11.
- [3] Kreuter. J. *Colloidal Drug Delivery Systems*. – New York: Marcel Dekker, 1994. 344 p.
- [4] Kratz F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles // *J. Cont. Rel.* – 2008. – 132. – P. 171-183.

[5] Weber C., Kreuter J., Langer K. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles // Int. J. Pharm. – 2000. – 196. – P. 197-200.

[6] Langer K., Balthasar S., Vogel V., Dinauer N., Schubert von B. N. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles // Int. J. Pharm. – 2003. – 257. – P. 169-180.

[7] Dreis S., Rothweiler F., Michaelis M., Cinatl Jr., Kreuter J., Langer K. Preparation, characterization and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles // Int. J. Pharm. – 2007. – 341. – P. 207-214.

[8] Kreuter. J., Burkeev M.Zh., Tazhbaev E.M., Kazhmuratova A.T., Zhmagalieva T.S., Zhaparova L.Zh. Synthesis and characterization of polymeric nanoparticles based on albumin // Bulletin of Karaganda University. – 2016.

REFERENCES

[1] Du Toit L.C., Pillay V., Danckwerts M.P. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches: Review // Respiratory Research. 2006. 7. 118. P. 1-18.

[2] Bui K.T., Alyautdin R.N. Poli(laktidnye) nanochastitzy s sorbirovannymi protivotuberkulyeznymi sredstvami // Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya. 2008. 3. P. 7-11.

[3] Kreuter. J. Colloidal Drug Delivery Systems. New York: Marcel Dekker, 1994. 344 p.

[4] Kratz F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles // J. Cont. Rel. 2008. 132. P. 171-183.

[5] Weber C., Kreuter J., Langer K. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles // Int. J. Pharm. 2000. 196. P. 197-200.

[6] Langer K., Balthasar S., Vogel V., Dinauer N., Schubert von B. N. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles // Int. J. Pharm. 2003. 257. P. 169-180.

[7] Dreis S., Rothweiler F., Michaelis M., Cinatl Jr., Kreuter J., Langer K. Preparation, characterization and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles // Int. J. Pharm. 2007. 341. P. 207-214.

[8] Kreuter. J., Burkeev M.Zh., Tazhbaev E.M., Kazhmuratova A.T., Zhmagalieva T.S., Zhaparova L.Zh. Synthesis and characterization of polymeric nanoparticles based on albumin // Bulletin of Karaganda University. 2016.

Резюме

Л. Ж. Жапарова, М. Ж. Бүркеев, Е. М. Тажбаев, Т. С. Жұмағалиева

ТҮБЕРКҮЛЕЗГЕ ҚАРСЫ ПРЕПАРАТ «П-АМИНОСАЛИЦИЛ ҚЫШҚЫЛЫМЕН» ИММОБИЛИЗАЦИЯЛАНҒАН АЛЬБУМИНДІ НАНОБӨЛШЕКТЕРДІ СИНТЕЗДЕУ ЖӘНЕ ЗЕРТТЕУ

Жұмыста түберкүлезге қарсы препарат п-аминосалицил қышқылының терапевтік әсерін жоғарылату мақсатымен оны күкіртті альбуминнің нанобөлшектерімен байланыстыру мүмкіндігі зерттелді. Адсорбция және енгізу әдістерімен дәрілік затпен иммобилизацияланған нанобөлшектердің физика-химиялық сипаттамалары келтірілді. Альбуминнің полимерлі матрицасынан п-аминосалицил қышқылының босап шығуының кинетикасы зерттелді.

Дәрілік затпен иммобилизацияланған альбуминді нанобөлшектердің оңтайлы физика-химиялық сипаттамалары және байланысу дәрежесінің жоғары мәндерге ие болуы түберкүлезге қарсы препарат п-аминосалицил қышқылының наносомалы үлгілерін қолданудың келешегі зор екендігін көрсетеді.

Түйін сөздер: полимерлі нанобөлшектер, альбумин, түберкүлезге қарсы препарат, п-аминосалицил қышқылы, адсорбция, енгізу.

Резюме

L. Zh. Zhaparova, M. Zh. Burkeev, Y. M. Tazhbayev, T. S. Zhumagalieva

SYNTHESIS AND INVESTIGATION
OF ALBUMIN NANOPARTICLES LOADED
WITH ANTITUBERCULOSIS DRUG “P-AMINOSALICYLIC ACID”

In this work the possibility of binding antituberculosis drug p-aminosalicylic acid with the nanoparticles of serum albumin with the aim of increasing the therapeutic efficacy of the drug is studied. The results of the investigation of physicochemical characteristics of nanoparticles loaded with the drug obtained by adsorption and incorporation methods are shown. Drug release kinetics of p-aminosalicylic acid from polymeric matrix of albumin is studied.

Optimal physicochemical characteristics of albumin nanoparticles loaded with the drug and high meanings of binding degree points on perspective of the use of nanosomal forms of antituberculosis drug “p-amino salicylic acid”.

Keywords: polymeric nanoparticles, albumin, antituberculosis drug, p-aminosalicylic acid, adsorption, incorporation.