

УДК 615.457.3; 543.544.5.068.7; 543.422.3
DOI: 10.15587/2519-4852.2017.109003

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПОСОМ НА СТЕПЕНЬ ИНКАПСУЛЯЦИИ И РАЗМЕР ЧАСТИЦ ПРИ СОЗДАНИИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЦИТОХРОМА С

© А. Г. Кацай, Е. А. Рубан, Ю. М. Краснопольский

Рассмотрено влияние состава липосом на степень инкапсуляции и размер частиц при фармацевтической разработке липосомальной формы цитохрома С.

Цель работы: изучение влияния состава липосом на степень инкапсуляции и размер частиц при создании липосомальной формы цитохрома С, применяемой в качестве средства для терапии офтальмологических заболеваний.

Методы. Липосомальная форма цитохрома С получена гомогенизацией высокого давления. Инкапсуляцию цитохрома С проводили по методу химической связи, который основан на возможности образования химической связи между компонентами бислойа липосом и активным фармацевтическим ингредиентом. Для определения степени инкапсуляции была разработана методика ВЭЖХ, основанная на методе гель-фильтрации. Определение проводили на хроматографе Shimadzu (Япония).

Результаты. Определен состав мембраны липосом позволяющий получить наночастицы с высокой степенью инкапсуляции цитохрома С – до 95,88 % и размером частиц в нанодиапазоне до 150 нм

Выводы: Проведено изучение оптимального состава мембраны липосом, содержащих дипальмитоилфосфатидилглицерол и фосфатидилхолин, для дальнейшего изучения этого липосомального комплекса в качестве средства терапии в офтальмологии.

Установлено что оптимальным составом липосом является соотношение фосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилглицерола (1,2–4,0:1), обеспечивающего максимальную инкапсуляцию цитохрома С в липосомах.

Разработаны методики определения степени инкапсуляции Ц-С. Инкапсуляция Ц-С составила не менее 95,0 %

Ключевые слова: Цитохром С, фосфолипиды, липосомы, гомогенизация, степень инкапсуляции, размер частиц

1. Введение

Цитохром С (Ц-С) является катализатором клеточного дыхания, который стимулирует окислительные реакции и процессы регенерации, активизирует метаболизм в тканях, а также уменьшает гипоксию ткани при различных патологических состояниях.

Ц-С широко используют в терапии офтальмологических заболеваний, где он проявляет высокую активность относительно свободных радикалов, связывает агрессивные молекулы оксидантов, защищает хрусталик и роговицу от повреждений; подавляет и предотвращает развитие помутнения хрусталика (катаракты), препятствует дегенерации сетчатки глаза.

2. Постановка проблемы в общем виде, актуальность темы и ее связь с важными научными или практическими вопросами

Сегодня на фармацевтическом рынке Украины известны глазные капли с Ц-С «ОФТАН КАТАХРОМ» производства «Сантен» Финляндия.

Эти капли являются водным раствором Ц-С, которые имеют ряд существенных недостатков: Ц-С незначительно проникает через биологические мембраны в клетки и достаточно быстро выводится из организма.

Указанные недостатки обуславливают снижение биодоступности и требуют длительной терапии препаратом [1]. Таким образом, одной из ключевых проблем повышения эффективности Ц-С содержащих препаратов в лечении офтальмологических заболеваний является создание лекарствен-

ных форм Ц-С, обладающих более высокой биодоступностью.

Для решения этой проблемы целесообразным является создание глазных капель на основе липосомальной формы цитохрома С (ЛС-Ц).

3. Анализ последних исследований и публикаций, в которых начато решение данной проблемы и на которые опирается автор

Наличие липидной части в молекуле комплекса обуславливает его липофильность, что облегчает проникновения комплекса через липидные участки биомембран, а также способствует удержанию его в деструктивных участках [2]. Что также, в свою очередь, увеличит проникновение Ц-С в ткани глаза и повысит эффективность использования цитохрома С. [3–5].

Так ранее, в работе [3], авторами было показано, что применение ЛС-Ц заметно замедляет начало развития катаракты.

Для доказательства терапевтической эффективности ЛС-Ц в сравнении с нативной формой Ц-С были проведены фармакологические исследования [4], которые показали, что предлагаемые ЛС-Ц обеспечивают повышенную терапевтическую эффективность (в 1,4–2,0 раза) при изученных патологиях и пролонгированность действия по сравнению с нативной формой Ц-С.

В работе [5] показано, что входящие в состав липосом (ЛС) фосфолипиды образуют полярную гидрофильную поверхность везикул и высоколипофильную среду внутри бислоя. Это создает характер-

ную для ЛС амбивалентность, что определяет условия для их проникновения через гидрофильные и липофильные среды глаза, в том числе через барьеры передней и задней камер глаза. Благодаря этому ЛС являются эффективным средством транспорта лекарственных препаратов при инстиляции в конъюнктивный мешок для целенаправленной доставки в конъюнктиву, хрусталик и ресничное тело.

4. Выделение нерешенных ранее частей общей проблемы, которой посвящена статья

ЛС занимают особое место в современных системах доставки, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с другими наночастицами. Современные требования к контролю ЛС средств изложены в монографии ДФУ 2.0 [6] и FDA «Guidance for industry Liposome Drug Products» [7]. Оценка степени инкапсуляции активного фармацевтического ингредиента (АФИ) и размера частиц является необходимым условием разработки ЛС средств.

Ранее в работе [3] степень инкапсуляции Ц-С в предложенные авторами ЛС композиции, содержащие соевый фосфатидилхолин, холестерин и стеарилламин, составила 35–38 %.

Степень инкапсуляции Ц-С в ЛС, состоящие из лецитина, холестерина и смеси кислых фосфолипидов [4], составила 55–60 %.

Составы ЛС [8], содержащие в своем составе смесь негативно заряженных фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, цереброзидов, сульфатцереброзидов, сфингомиелина), обеспечивали степень инкапсуляции 70–85 %

В этом исследовании был предложен состав ЛС, обеспечивающий инкапсуляцию Ц-С не менее 95 %.

5. Формулирование целей (задач) статьи

Исследования посвящены изучению влияния состава липосом (ЛС) на степень инкапсуляции и размер частиц при создании ЛС-Ц, применяемой в качестве средства для терапии офтальмологических заболеваний.

6. Изложение основного материала исследования (методов и объектов) с обоснованием полученных результатов

Хорошо известна способность Ц-С образовывать комплексы с анионными фосфолипидами в биологических мембранах [9, 10], что является определяющим в белок-липидном взаимодействии Ц-С. Основываясь на этих данных предложено использовать в составе наночастиц анионный фосфолипид – дипальмитоилфосфатидилглицерин (ДПФГ). В качестве мембранообразующего липида использован основной компонент мембран эукариотов – фосфатидилхолин (ФХ). Используя эти компоненты в различных соотношениях и концентрациях после проведения экспериментального изучения, предложен состав, обеспечивающий максимальную инкапсуляцию Ц-С. Причем, степень инкапсуляции Ц-С зависит от соотношения используемых липидных компонентов и количества взятого Ц-С. В этих условиях положительно заряженные аминокислотные группы на молекулах Ц-С вступают во взаимодействие с отрицательно заряженными группами на молекуле ДПФГ.

Предложена схема получения ЛС-Ц, которая сводится к получению пленки липидов и её эмульгированию в растворе Ц-С для получения эмульсии мультиламелярных везикул с последующей гомогенизацией высокого давления и стерилизующей фильтрацией [11].

Были исследованы 6 композиций мембран ЛС с соотношением (ФХ:ДПФГ) 5,0:1,0; 4,0:1,0; 3,6:1,0; 2,4:1,0; 1,20:1,0; 0,6:1,0.

ДПФГ и ФХ в растворяли в смеси хлороформ:этанол (4:1). Полученный раствор упаривали на ротационном испарителе BUCHI Rotavapor R215 (Швейцария) до образования липидной пленки. Липидную пленку гидратировали раствором Ц-С, при соотношении Ц-С: липиды – 1: 16–35 соответственно, на орбитальном шейкере IKA werke (Германия) до образования гомогенной эмульсии мультиламелярных ЛС.

Полученную эмульсию мультиламелярных ЛС гомогенизировали на гомогенизаторе высокого давления microfluidizer M110P (USA) Оптимальный температурный режим гомогенизации находился в пределах 38–44 °С и давлении 900 bar. Все работы по получению липосом проводили в атмосфере азота. В случаях, когда включение Ц-С было неполным, «свободный» Ц-С оставшийся в водной среде может быть отделен ультрафильтрацией. Полученную ЛС эмульсию подвергали стерилизующей фильтрации через мембранные фильтры Pall (США) 0,22 мкм.

Преимуществом получения ЛС методом гомогенизации высокого давления является стандартность и возможность масштабирования, высокая производительность метода, минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов, сохранение лекарственного препарата, стабильность ЛС и возможность постоянного контроля температуры и давления в процессе технологии. Режим гомогенизации позволяет получить ЛС стандартного состава, основная масса которых представлена частицами размером 120–150 нм.

Для определения степени инкапсуляции Ц-С были предложены методики определения общей концентрации Ц-С и концентрации не инкапсулированного Ц-С.

Общую концентрацию Ц-С в ЛС-Ц (C_{total}) количественно определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Shimadzu UV1800 (Япония) используя УФ спектр поглощения разведенной эмульсии ЛС-Ц в диапазоне 400–560 нм (рис. 1).

Определение «свободного» Ц-С (C_{free}) проводили методом гель-хроматографии [12].

Использовали хроматограф Shimadzu, колонка хроматографическая размером Tricorn 5/200 column (Ge Healthcare), заполненную сорбентом "superose 12", подвижная фаза (4,515 г/л KH_2PO_4) рН до 6,0 (2 М NaOH); скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин; детектирование при длине волны 409 нм; температура колонки 25 °С.

Поочередно хроматографировали растворы субстанции Ц-С и ЛС-Ц.

Степень инкапсуляции (ЕЕ) рассчитывали по формуле

$$EE \% = [(C_{total} - C_{free}) / C_{total}] \times 100$$

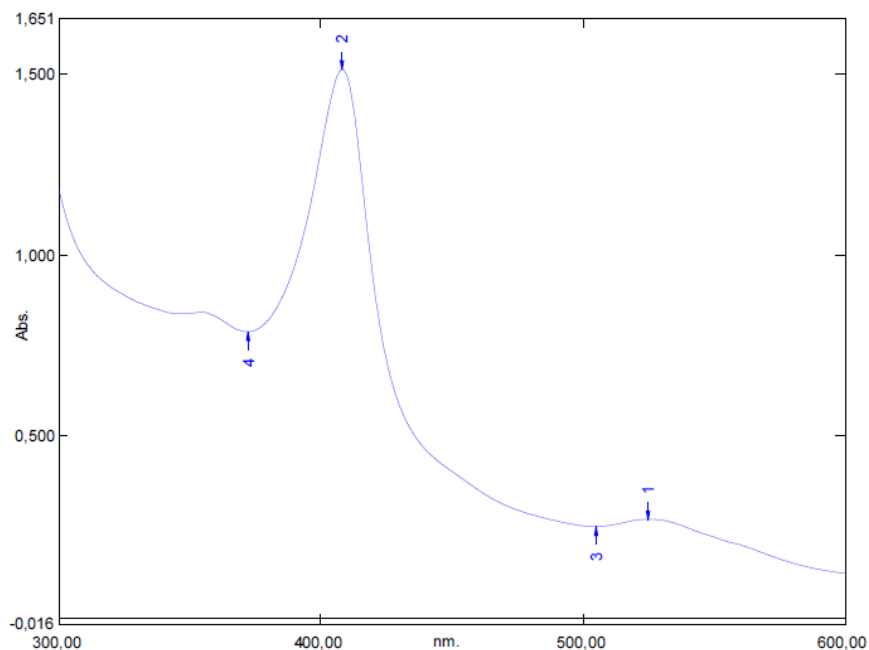


Рис. 1. УФ-спектр раствора ЛС-Ц

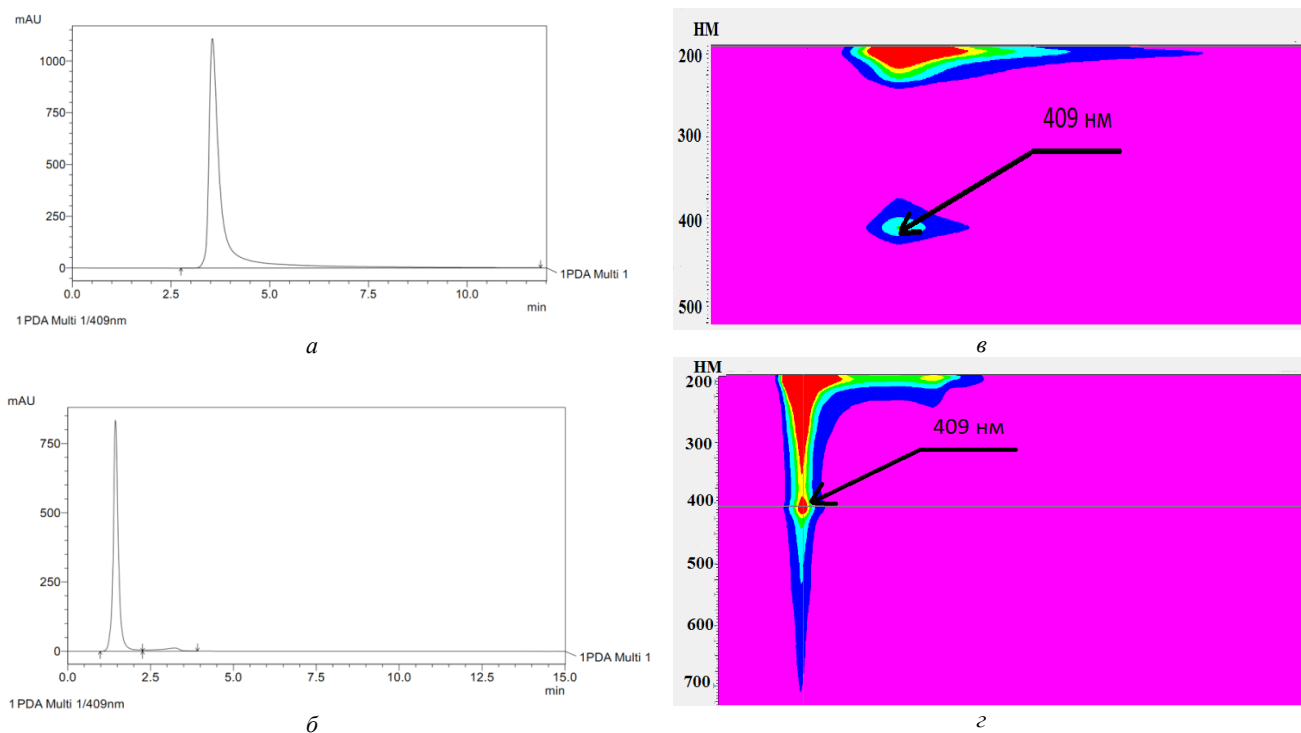


Рис. 2. Хроматограммы растворов стандарта Ц-С и ЛС-Ц; *a* – хроматограмма раствора стандарта цитохрома С, 409 нм; *б* – хроматограмма липосом с цитохромом С 409 нм; *в* – хроматограмма раствора стандарта цитохрома С, 200–800 нм; *г* – хроматограмма липосом с цитохромом С, 200–800 нм

Как видно из рис. 2 пики ЛС и Ц-С имеют различные времена удерживания. Характерные максимумы УФ-спектра поглощения в областях 400–410 нм и 520–560 нм наблюдаются в спектрах пиков раствора стандарта Ц-С (200–800 нм) и ЛС-Ц (200–800 нм).

Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния, используя Malvern zetasizer nano S (UK) рис. 3. Зависимость значений среднего размера ЛС и степени инкапсуляции от фосфолипидного состава представлены в (табл. 1).

Таким образом, результаты физико-химических исследований свидетельствуют о том, что оптимальным является соотношение ФХ: ДПФГ (1,2–4,0:1); увеличение соотношения до 5:1, как и уменьшение соотношения 1,0:0,6 приводит к значительному снижению включения Ц-С в ЛС при сохранении частиц в нанодиапазоне до 150 нм.

Полученный размер ЛС наночастиц позволяет проводить стерилизующую фильтрацию через мембранные фильтры 0,22 мкм.

Размер. Распределение по интенсивности.

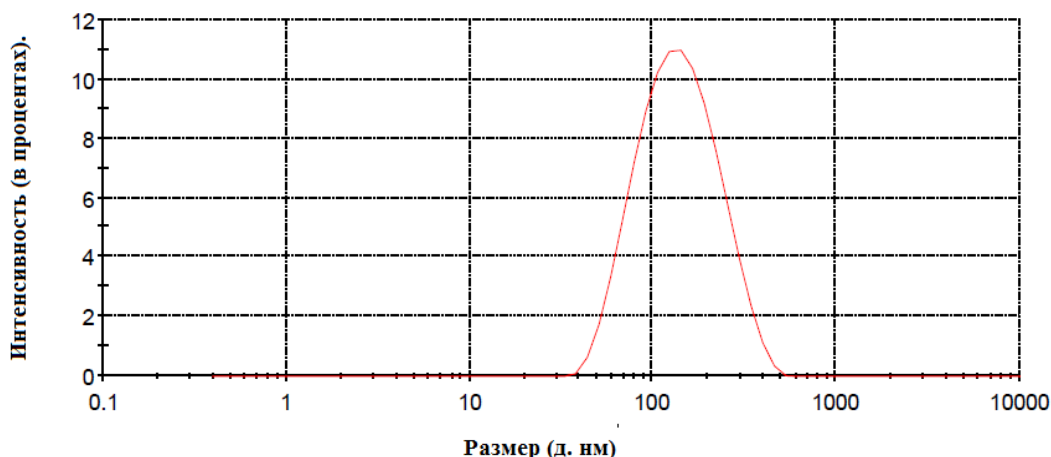


Рис. 3 Распределение размера частиц ЛС-Ц

Таблица 1

Параметры технологии получения ЛС-Ц

Состав ЛС ФХ: ДПФГ	5,0:1,0	4,0:1,0	3,6:1,0	2,4:1,0	1,20:1,0	1,0:0,6
Средний размер ЛС	138,2 нм – 92,1 %, 37,8 нм – 7,9 %.	133,2 нм – 93,1 %, 47,8 нм – 6,9 %.	147,2 нм – 90,1 %, 30,8 нм – 9,9 %	138,2 нм – 92,1 %, 37,8 нм – 7,9 %.	132,6 нм – 93,1 %, 47,8 нм – 6,9 %	130,2 нм – 87,1 %, 47,8 нм – 12,9 %
Степень инкапсуляции	68,78 %	81,58 %	89,88 %	94,88	95,88 %	71,5 %

7. Выводы

1. Проведено изучение оптимального состава мембраны ЛС содержащей дипальмитоилфосфатидилглицерол и фосфатидилхолин, для дальнейшего изучения этого липосомального комплекса в качестве средства терапии в офтальмологии.

2. Установлено что оптимальным составом липосомы является соотношение фосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилглицерола (1,2–4,0:1), обеспечивающее максимальную инкапсуляцию Ц-С в ЛС.

3. Разработаны методики определения степени инкапсуляции Ц-С. Инкапсуляция Ц-С составила не менее 95,0 %.

Литература

- Mayer, H. Objective evaluation of cataract development under treatment with cytochrome C, sodium succinate, adenosine, nicotinamide and sorbitol [Text] / H. Mayer, H. König // Fortsch. Ophthalmol. – 1987. – Vol. 84. – P. 261–264.
- Кривцова, И. М. Цитохром С – фосфолипидный комплекс (подготовка и исследование в эксперименте) [Текст]: сб. науч. тр. / И. М. Кривцова, Н. М. Алексеева // Цитохром С и его клиническое применение. – Ленинград: СО РАМН, 1990. – С. 74–78.
- Zhang, J. Freeze-dried liposomes as potential carriers for ocular administration of cytochrome against selenite cataract formation [Text] / J. Zhang, P. Guan, T. Wang, D. Chang, T. Jiang, S. Wang // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2009. – Vol. 61, Issue 9. – P. 1171–1178. doi: 10.1211/jpp.61.09.0006
- Пат. № 2110990 RU. Липосомальная везикула с Цитохромом С. МПК А61К9/127 [Текст] / Шанская А. И., Криворучко Б. И., Бушнева Е. В. и др. – № 94027343/14; заявл. 14.07.1994; опублик. 20.05.1998.
- Аляутдин, Р. Н. Транспорт лекарственных средств через роговицу глаза: перспективы применения липосомальных лекарственных форм [Текст] / Р. Н. Аляутдин, И. Н. Иежица, Р. Агарвал // Вестник офтальмологии. – 2014. – Т. 130, № 4. – С. 117–122.
- Липосомальні препарати [Текст]. – Державна Фармакопея України 2.0. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – С. 1036–1038.
- Liposome drug products. Chemistry, manufacturing, and controls; Human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation. Guidance for industry [Electronic resource]. – U.S. Department of health and human services food and drug administration center for drug evaluation and research (CDER). FDA, 2015. – Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidanceregulatoryinformation/guidances/ucm070570.pdf>
- Пат. № 44318 UA. Спосіб одержання липосомального цитохрому С. МПК А61К9/00 [Текст] / Іванова Н. М. – № u200905288; заявл. 27.05.2009; опубл. 25.09.2009, Бюл. № 18.
- Gorbenko, G. P. Cytochrome c Interaction with Cardiophilin/Phosphatidylcholine Model Membranes: Effect of Cardiophilin Protonation [Text] / G. P. Gorbenko, J. G. Molotkovsky, P. K. J. Kinnunen // Biophysical Journal. – 2006. – Vol. 90, Issue 11. – P. 4093–4103. doi: 10.1529/biophysj.105.080150

10. Mohn, E. S. Interactions of Cytochrome c with N-Acylated Phosphatidylethanolamine Lipids [Text] / E. S. Mohn, J.-M. Lee, C. Beaver, G. Tobbe, S. M. McCarthy, E. O'Neil et. al. // The Journal of Physical Chemistry A. – 2014. – Vol. 118, Issue 37. – P. 8287–8292. doi: 10.1021/jp502063e

11. Пат. № 022183 Евразийское патентное ведомство. Способ получения липосомальной формы цитохрома С [Текст] / Шоболов Д. Л., Краснопольский Ю. М., Ульянов А. М. и др.; патентовладелец ООО «ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВ». – № 201201592; заявл. 30.11.2012; опублик. 24.12.2015. – 9 с.

12. Кацай, О. Г. Розроблення та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах [Текст] / О. Г. Кацай, В. В. Прохоров, Г. С. Григор'єва, Ю. М. Краснопольський // Фармацевтичний журнал. – 2016. – № 5. – С. 69–75.

Дата надходження рукопису 10.05.2017

Кацай Алексей Григорьевич, аспирант, кафедра заводской технологии лекарств, Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина, 61002
E-mail: alexkat-1@yandex.ru

Рубан Елена Анатольевна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой, кафедра заводской технологии лекарств, Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина, 61002
E-mail: ruban_elen@ukr.net

Краснопольский Юрий Михайлович, доктор фармацевтических наук, профессор, кафедра биотехнологии, биофизики и аналитической химии, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», ул. Кирпичёва, 2, г. Харьков, Украина, 61002
E-mail: biotech_ntu_khpi@ukr.net

УДК 615.1:615.011:615.46:621.7/.9(083.75)

DOI: 10.15587/2519-4852.2017.109071

НОРМАТИВНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА, КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ НАНОМАТЕРІАЛІВ

© С. Б. Білоус, Т. Г. Калинюк

Мета. Аналіз українських нормативних документів щодо лікарських засобів на основі наноматеріалів та вивчення міжнародного досвіду з питань їх розробки, контролю якості та безпечності.

Методи. Використано методи інформаційного пошуку та аналізу даних літератури.

Результати. Проведено аналіз Державної фармакопеї України, наказів МОЗ України та інших українських нормативних документів щодо лікарських засобів на основі наноматеріалів, а також нормативно-правової бази ЄС щодо нанотехнологій та наноматеріалів. Обґрунтовано необхідність розробки та затвердження в Україні нормативно-правової бази з щодо лікарських засобів на основі наноматеріалів.

Висновки. Питання доцільності опрацювання нормативно-правової бази створення лікарських засобів на основі наноматеріалів в Україні є беззаперечним. У цьому напрямку вже зроблені перші кроки, однак питання ще далеко від вирішення. Відсутність нормативних вимог до виробництва та контролю якості і безпечності лікарських засобів з наноматеріалами ускладнює їх розробку та унеможливорює впровадження у виробництво

Ключові слова: наноматеріали, нанотехнології, лікарські засоби, нормативні документи, контроль якості, безпечність, стандарти

1. Вступ

Станом на 2017 рік в Україні значна кількість лікарських засобів на основі наноматеріалів розробляється і знаходиться на стадії доклінічних досліджень. Для їх подальшого впровадження у виробництво першочергового вирішення потребує проблема розробки, гармонізації та імплементації законодавчо врегульованої нормативно-правової та методичної бази, яка дозволить виготовляти якісну та безпечну продукцію.

2. Постановка проблеми у загальному вигляді, актуальність теми та її зв'язок із важливими науковими чи практичними питаннями

У зв'язку з неврегульованістю нормативної бази, наноматеріали на даний час активно запроваджуються у медицину не в якості лікарських засобів, а в якості виробів медичного призначення та косметичних продуктів, так як для них не вимагається проведення якісного та кількісного аналізу компонентів, а лише проведення санітарно-гігієнічної експертизи.