

ОСОБЛИВОСТІ МЕХАНІЗМУ ІНКАПСУЛЯЦІЇ ПРИ СТВОРЕННІ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ФОРМ ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Стадниченко А.В.¹, Краснопольский Ю.М.², Ярних Т.Г.¹

- 1) Національний фармацевтичний університет м. Харків, Україна
- 2) Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут» м. Харків, Україна

Вступ. Використання цитостатиків, як лікарських препаратів, є приклад компроміса між тяжкістю захворювання і необхідністю лікарського ефекту. Особливість цитостатичних речовин – це орієнтованість на сворення перешкод реплікації генетичного матеріалу, що призводить до подальшої загибелі клітини. Однак, на жаль, цитостатики є неселективними речовинами, і спричиняють як терапевтичну дію, так і побічні ефекти, тяжкість яких лімітує їх застосування у клініці [1,2].

Створення ліпосомальних форм високотоксичних хіміотерапевтичних агентів є однією із форм боротьби з токсичністю, можливістю покращити якість життя пацієнта та збільшити дозу препарату, що покращує терапевтичний ефект [2,3].

Мета дослідження. Однією з головних завдань під час фармрозробки ліпосомальної форми препарату, є забезпечення максимальної інкапсуляції активної речовини у наночастки при розробці складу препарату та створення технології виготовлення. Виникла потреба проаналізувати доступні шляхи інкапсуляції і експериментально показати її ефективність.

Методи дослідження. Для проведення експерименту використовували: яєчний фосфатидилхолін (Lipoid, Німеччина); Холестерин (Sigma-Aldrich, США). Ліпідну плівку отримували на ротаційному випарнику Buchi Rotovar R-210 із вакуум контролером, при остаточному тиску 15 мм.рт.ст. Для гомогенізації використовували УЗ баню «Сапфір» об'ємом 2,8 л, робочою частотою 35 кГц, потужністю генератора 130 Вт, екструдери Avestin Emulsiflex C-3 та Microfluidics Microfluidizer M-110P. Розмір ліпосом визначали методом лазерної дифракції на приладі Malvern Instruments «Zetasizer Nano ZS». Ультрафільтрацію проводили на установці «Minim 2», фірми PALL. Використовували ультрафільтраційні касети із верхньою межею відсікання 30 кДа. Визначення ступеню інкапсуляції проводили методом ВЕРХ на приладі Shimadzu LC-20 [5].

Основні результати. Одним із головних критеріїв ефективності нанорозмірних систем доставки є ступень інкапсуляції у частки – носії активної речовини. Цей параметр визначається фізико-хімічними методами, звичайно це метод високоефективної рідинної хроматографії із різними типами детекторів – спектрофотометричний, флюориметричний, детектор випаровування-

розсіювання світла (ELSD), із використанням метода гел'єв фільтрації як принципу розподілення цільових компонентів.

Можно перерахувати наступні, найбільш значущі технологічні способи інкапсуляції активних речовин у ліпосоми:

- 1) Метод пасивної інкапсуляції;
- 2) Метод сорбції на поверхню ліпосомального бішару;
- 3) Метод захоплення гідрофобної речовини усередину ліпосомального бішару;
- 4) Метод активного завантаження активної речовини.

Перший метод пасивної інкапсуляції застосовується для гідрофільних молекул, і представляє собою захоплення розчину, у якому розчинена лікарська речовина під час формування ліпосом. Здебільш використовується під час досліджень, а також у комбінації із іншими, більш результативними методами. По підтвердженим даним, ступень інкапсуляції під час використання пасивної інкапсуляції становить 9 – 10 %, що само по собі недостатньо для створення лікарського засобу [6].

Метод сорбції на поверхню ліпосомального бішару вимагає визначення електронного розподілення на поверхні активної молекули, і модифікації мембрани йоногенними ліпідами для створення умов для електростатичної взаємодії. Так, прикладом сорбції на поверхню може бути створення ліпосом із оксаліплатином. Для оптимального показника сорбції було досліджено декілька зарядів поверхні мембрани, і найбільш ефективним було визнано модифікацію дипальмітоїлфосфатидилгліцеролом, при цьому мембрана набувала негативного заряду. При реалізації цієї технології, поруч із технологією пасивної інкапсуляції, на етапі перед ліофільною сушкою показник захоплення оксаліплатину досягає 60 %.

Метод захоплення гідрофобної речовини усередину ліпосомального бішару можливо застосувати лише для гідрофобних, водонерозчинних молекул. В цій технології розчин активної речовини готується безпосередньо при формуванні ліпідної плівки, і при формуванні ліпосом активна речовина розподіляється у гідрофобній частині мембрани, яка сформована залишками жирних кислот. Прикладом такої технології можуть стати ліпосоми із доцетакселом та паклітакселом, і варто зазначити, що ступень інкапсуляції складає в цьому випадку 100 %.

Метод активного завантаження може бути проілюстровано на прикладі активної речовини – іринотекана. Ліпосоми формуються в середовищі лимонної кислоти із концентрацією 0,2М та рН 1,9; після формування навколишній буфер замінюється на фосфатний, із рН 5,0. Частина молекул іринотекану ($pK_a=6.57$) знаходячись зовні ліпосоми при рН 5,0, перебуває у депротонізованому, молекулярному вигляді, і сорбується на поверхні мембрани, проникає через бішар в середину ліпосоми. Там молекули приєднують протони, набувають позитивного заряду і втрачають можливість проходження в зворотній бік, оскільки через гідрофобну частину бішару може проходити лише речовини, які не мають поверхневого заряду, у молекулярній формі. Це викликано тим, що

молекула має пройти через гідрофобний шар, який сформовано залишками жирних кислот ліпідів. Таким чином, відбувається накопичення іринотекану всередині ліпосом, і ефективність інкапсуляції доходить до 95 – 98 %. Ефективність накопичення залежить від різниці рН зоні та усередині ліпосом – так званого «хімічного градієнту», у різновиді «градієнту рН». Також, кількість інкапсульованої речовини залежить від ємності внутрішнього буферу, цим обумовлено використання висококонцентрованих розчинів. Так, у разі створення ліпосомального іринотекану концентрація внутрішнього буферу складала 0,2 М.

Вивчення та комбінація цих методів дозволяє створити новітні високоефективні системи доставки лікарських засобів і, як наслідок, покращити ефективність терапії.

Висновки. 1) Проаналізовано основні методи інкапсуляції активної речовини - цитостатиків у ліпосомі. 2) Продемонстровано особливості кожного із перелічених методів. 3) Показано, і підтверджено експериментально, що по показнику ефективності інкапсуляції механізми розташовуються у наступній послідовності: Метод захоплення гідрофобної речовини усередину ліпосомального бішару; Метод активного завантаження активної речовини; Метод сорбції на поверхню ліпосомального бішару; Метод пасивної інкапсуляції.

Список літератури

1. Andrew W.M. Lynch Rethinking clinical trials for cytostatic drugs / W.M. Andrew, P.L. Kevin // Nature Reviews Cancer. – 2003. – Vol.3. – P.540-545.
2. Fröhlich K. Efficacy of cytostatic drugs on breast cancer spheroids and toxicity on trophoblast cells / K. Fröhlich, S. Morgner, L. Hauswald, et. al. // Placenta. – 2016. – Vol.45. – P.107-112.
3. Rafiyath S.M. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. / S.M. Rafiyath, M. Rasul, B. Lee et. al. // Experimental Hematology & Oncology. – 2012. – Vol.1. – P.1-10.
4. Mishra J. Evaluation of toxicity & therapeutic efficacy of a new liposomal formulation of amphotericin B in a mouse model. / J. Mishra, A. Dey, N. Singh // Indian J Med Res. – 2013. – Vol.137. – P.767-776.
5. Стадниченко А.В. Разработка и валидация методики определения степени инкапсуляции иринотекана гидрохлорида в липосомы / А.В. Стадниченко, Ю.М. Краснопольский, В.И. Швец. // Биофармацевтический журнал, – 2015. – Т.7, – №1. – С.53-55
6. Стадниченко А.В. Определение внутреннего объёма липосом с иринотеканом / А.В. Стадниченко, Ю.М. Краснопольский, Т.Г. Ярных. // Украинский биофармацевтический журнал. – 2016. – Т.46. – №5. – С.64-67.