

СФЕРИЧЕСКИЕ АМОΡФНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ, ЗАГРУЖЕННЫЕ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ СУБСТАНЦИЕЙ РИФАБУТИНОМ

А.П. Каплун, профессор, Н.И. Пахарькова, магистр, Л.А. Поручикова, аспирант, Д.А. Безруков, ассистент, *В.И. Попенко, профессор,

В.И. Швеи, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В.Ломоносова

*Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН

e-mail: alexander.p.kaplun@gmail.com

Описываются свойства сферических аморфных наночастиц, загруженных рифабутинном – противотуберкулезной субстанцией. Показано, что при загрузке 5% от массы носителя рифабутин загружается полностью.

Properties of spherical amorphous nanoparticles loading with antituberculosis substance rifabutin are described. It was shown that rifabutin is loaded completely when content of the substance is 5% from the mass of carrier.

Ключевые слова: сферические аморфные наночастицы, тритерпеноиды, береста, рифабутин.

Key words: spherical amorphous nanoparticles, triterpenoids, birch bark, rifabutin.

Наночастицы, как средства доставки лекарственной субстанции, имеют важные преимущества над традиционными лекарственными формами. В настоящий момент только липосомы и жировые эмульсии используются в качестве лекарственных препаратов [1]. Однако эти наночастицы имеют существенные недостатки: низкая стабильность при хранении, невысокая эффективность включения субстанции, относительно высокая стоимость.

Поэтому актуальным является поиск новых типов нанодисперсий, свободных от перечисленных недостатков. Одним из вероятных кандидатов могут быть нанодисперсии из тритерпеноидов бересты – смесь гидрофобных тритерпеноидов лупанового ряда (рис. 1), основным компонентом которой является бетулин (~65%). Это дает основание предположить, что такие наночастицы могут служить переносчиками гидрофобных лекарственных субстанций.

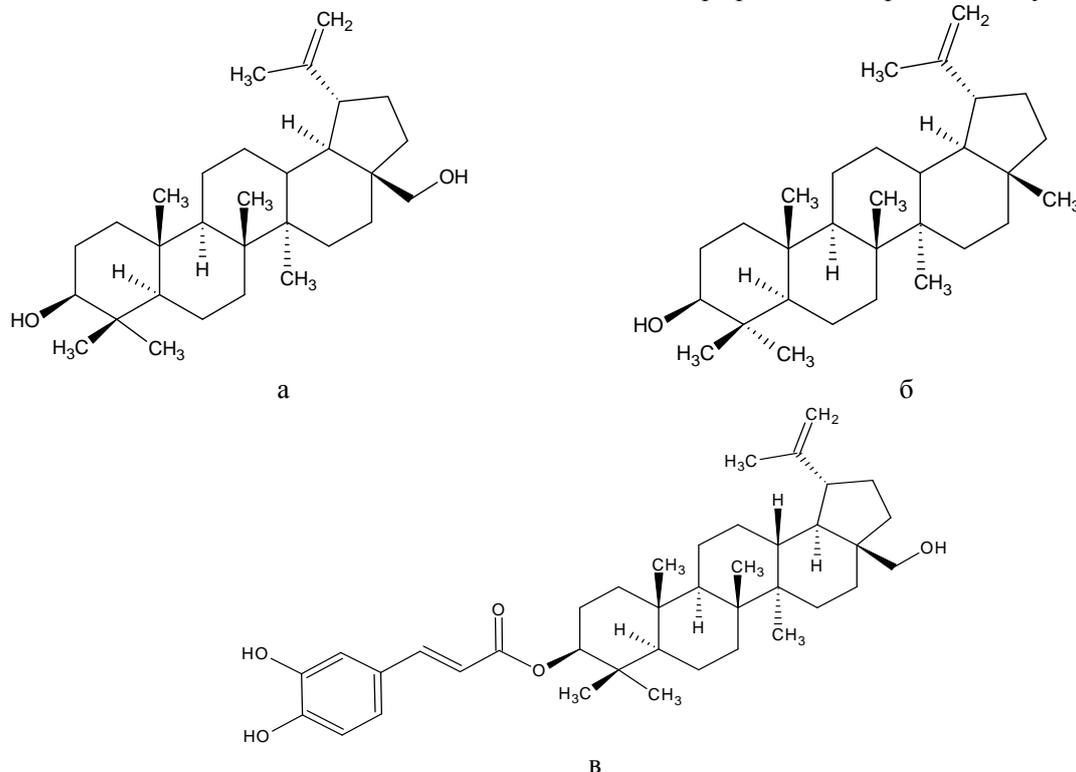
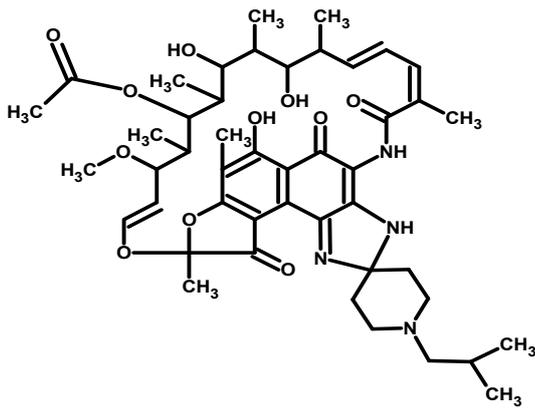


Рис. 1. Основные компоненты тритерпеноидов бересты: бетулин (а), лупеол (б), кофеат бетулина (в).

Метод получения сферических аморфных наночастиц, разработанный в нашей лаборатория [2, 3], позволяет включать в них гидрофобные вещества. Мы исследовали

включение гидрофобной противотуберкулезной субстанции рифабутина ($\text{Log } P = 4.13 \pm 1.00$).



Лечение туберкулеза осложнено, во многом, тем, что микобактерии локализуются в макрофагах. С другой стороны, поскольку макрофаги охотно поглощают наночастицы [4], именно наночастицы могут служить удобным средством доставки противотуберкулезных субстанций.

Полученные дисперсии на основе тритерпеноидов бересты исследовали по нескольким параметрам: размер частиц, агрегационная устойчивость, эффективность включения субстанции, морфология полученных частиц. Размер частиц определяли турбидиметрически, агрегационную стабильность – по доле осевших частиц после центрифугирования; долю включившейся субстанции – по результатам гель-фильтрации дисперсий (табл. 1).

Таблица 1. Физико-химические свойства сферических аморфных наночастиц, загруженных рифабутином.

Доля рифабутината от массы тритерпеноидов, %	Диаметр, нм	Свойства	
		Стабильность (уменьшение мутности после центрифугирования, %)	Доля включившегося вещества, %
0	140	50	-
2	153	95	100
5	155	90	100
10	145	90	56
20	888	70	65

Исследовали пять дисперсий с различным содержанием субстанции: 0, 2, 5, 10 и 20%. Диаметр наночастиц существенно не изменялся, за исключением последней дисперсии. Загрузка наночастиц рифабутином существенно уменьшала агрегационную стабильность. При начальной загрузке 2 и 5% вещество полностью включалось в наночастицы; добавление к тритерпеноидам бересты 10 и 20% рифабутината приводило к тому, что включалось около 60% взятого вещества, оставшаяся часть образовывала отдельные кристаллы.

Исследование морфологии позволяет определить форму загруженных рифабутином нано-

частиц и присутствие несферических наноструктур и не включившегося гидрофобного вещества.

Так, на представленной микрофотографии (рис. 2) видно, что основную массу частиц представляют сферические наночастицы со средним размером 100-200 нм с небольшим числом крупных кристаллов (возможно, рифабутината). Отделение этих кристаллов от основной массы представляет большую сложность, поэтому получать следует нанодисперсии с 5% рифабутината, так как в этом случае эффективность включения составляет 100%, и на электронных фотографиях не наблюдаются никакие отличные от сферических частицы.

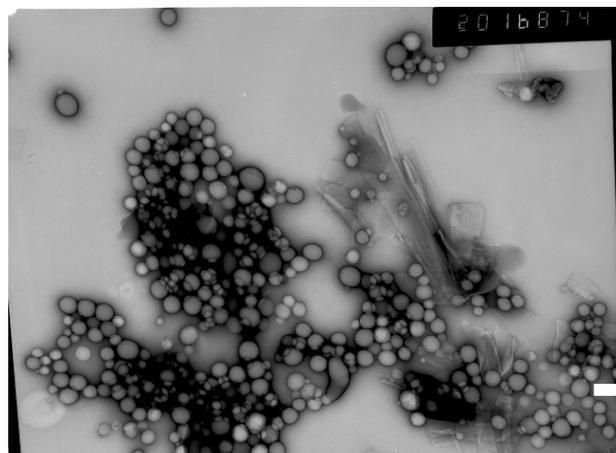


Рис. 2. Электронная микрофотография дисперсии наночастиц тритерпеноидов бересты с 10% рифабутината. Масштабный отрезок 500 нм.

Таким образом, разработан простой способ получения сферических аморфных наночастиц, загруженных не менее чем 5% рифабутин. Данные наночастицы планируется использовать в биологических исследованиях.

Экспериментальная часть

Тритерпеноиды бересты были любезно предоставлены ООО «Березовый мир», остальные реактивы квалификации ч.д.а. или х.ч.

В работе использовались: испаритель ротационный Laborota 4000 (Heidolph Instruments, Германия), магнитная мешалка Ika RN basic (Ika Labortechnik, Германия), ультразвуковая баня Sonogex ТК-52 (Bandelin, Германия), спектрофотометр DU®-7 (Beckman, США). Для гель-хроматографии использовали колонку NAP-5 Sephadex G-25 (Amersham Biosciences, США). Образцы для электронных микрофотографий получали негативным контрастированием 1% водным раствором уранилацетата. Микрофотографии получали с помощью электронного микроскопа Joel 100СХ (Япония) при инструментальном увеличении 10 или 20 тыс.

Приготовление сферических аморфных наночастиц, загруженных рифабутином

В колбу с раствором 5 мг тритерпеноидов и 2, 5, 10 или 20% рифабутин в 1 мл ТГФ при интенсивном перемешивании впрыскивали 25 мл воды. Дисперсию перемешивали еще в течение 5 мин. Растворитель упаривали на роторном испарителе до объема 9 мл при температуре не

выше 40°C.

Определение эффективности включения рифабутин в сферические аморфные наночастицы

На колонку со слоем сорбента Sephadex G-25 высотой 2 см наносили 200 мкл дисперсии наночастиц, загруженных рифабутином. Элюировали дистиллированной водой, собирали 12 фракций по 0.5 мл. Измеряли оптическую плотность каждой фракции, строили профиль элюции. Объединяли фракции с вышедшим рифабутином, измеряли их объем и поглощение. Объединяли фракции с вышедшими наночастицами. По этим данным рассчитывали эффективность включения рифабутин.

Агрегационная стабильность загруженных наночастиц

Из дисперсии отбирали по две пробы, объемом 100 мкл, добавляли по 900 мкл дистиллированной воды к каждой. Одну из проб центрифугировали 10 мин при ускорении 11000 g. Затем измеряли оптическую плотность пробы до и после центрифугирования. Долю осевших частиц вычисляли по формуле:

$$\omega = \frac{D_{нач.} - D_{конеч.}}{D_{нач.}} 100\%$$

Работа проводилась при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (госконтракт № 02.512.11.2328.

ЛИТЕРАТУРА:

1. От липосом семидесятых к нанобиотехнологии XXI века / В. И. Швец, А. П. Каплун, Ю. М. Краснопольский, А. Е. Степанов, В. П. Чехонин // Российские нанотехнологии. – 2008. – Т. 3, № 11-12. – С. 52–66.
2. Патент РФ 2322091. Композиция биологически активных веществ и способ получения её нанодисперсии / А. Н. Чистяков, Г. А. Преснова, В. В. Балакшин, А. П. Каплун. – № 2006127735/13 ; заявл. 01.08.2006 ; опубл. 20.04.2008. – Бюл. № 11.
3. Солубилизация тритерпеноидов лупанового ряда, выделенных из бересты / А. Н. Бастрин, В. В. Красильникова, Т. Н. Лыу, В. И. Попенко, А. П. Каплун, В. В. Балакшин, Г. А. Преснова, А. Н. Чистяков / Биотехнология. – 2008. – № 6. – С. 51–59.
4. Oh, Y.-K. Impact of *Mycobacterium avium* infection on macrophage-liposome interaction / Y.-K. Oh, R. M. Straubinger / J. Liposome Res. – 1997. – Vol. 7. – P. 101–114.