

УДК 615.014.22 + 615.45:615.322

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ С КИСЛОТОЙ ЯНТАРНОЙ И ЭКСТРАКТОМ ПРОПОЛИСА

¹Симонян Е.В., ²Шикова Ю.В., ¹Осиков М.В., ¹Григорьева Г.П., ¹Ножкина Н.Н.,
¹Саедгалина О.Т., ¹Абрамовских К.А., ¹Юмагузина А.Т.

¹ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, e-mail: kanc@chelsma.ru;

²ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Уфа, e-mail: admin@bsmu.anrb.ru

На основании экспериментальных исследований предложен оптимальный состав липосомальной лекарственной формы с кислотой янтарной и экстрактом прополиса. Установлено, что оптимальным способом получения липосомальной лекарственной формы кислоты янтарной следует считать экструзионный метод. Для повышения стабильности и достижения максимального включения кислоты янтарной предложено использовать сочетание фосфолипида с холестерином. Изучено влияние вспомогательных веществ на эффективность включения кислоты янтарной. В опытах *in vitro* изучено влияние действующих веществ на процессы перекисного окисления липидов и антиоксидантную активность лекарственной формы. Было установлено, что присутствие в качестве антиоксиданта кислоты янтарной препятствует образованию продуктов окисления липидов, а введение в качестве действующего вещества экстракта прополиса способствует потенцированию антиоксидантного эффекта.

Ключевые слова: липосомы, лецитин, холестерин, кислота янтарная, экстракт прополиса

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR LIPOSOMAL DOSAGE FORMS SUCCINIC ACID AND PROPOLIS EXTRACT

¹Simonyan E.V., ²Shikova Y.V., ¹Osikov M.V., ¹Grigoreva G.P., ¹Nozhkina N.N.,
¹Saedgalina O.T., ¹Abramovskikh K.A., ¹Yumaguzhina A.T.

¹South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, e-mail: kanc@chelsma.ru;

²Bashkir State Medical University, Ufa, e-mail: admin@bsmu.anrb.ru

Based on experimental studies, the optimal composition of the liposome formulation with succinic acid and propolis extract. It was found that the best way to get the liposomal dosage form succinic acid should be considered as an extrusion method. To enhance the stability and maximize the inclusion of succinic acid is proposed to use a combination of phospholipid to cholesterol. The effect of excipients on the effectiveness of the inclusion of succinic acid. In *in vitro* experiments to study the effect of active substances on lipid peroxidation and antioxidant activity of the dosage form. It has been found that the presence of succinic acid as an antioxidant prevents the formation of lipid oxidation products, and the introduction of the active substance propolis extract promotes potentiation of the antioxidant effect.

Keywords: liposomes, lecithin, cholesterol, succinic acid, propolis extract

Одним из актуальных направлений в фармацевтической технологии является разработка липосомальных лекарственных форм, обладающих рядом преимуществ. Введенные в организм липосомы с лекарственным веществом взаимодействуют с мембранами клеток, связываются с ними и передают клетке лекарственный препарат. Включение лекарственных средств в липосомы может изменить фармакинетику и биораспределение препарата, приводящее к повышению эффективности.

При этом важно проводить исследование в отношении лекарственных средств, отличающихся нестабильностью и высокой скоростью метаболизма. К числу таких препаратов относится кислота янтарная [2, 3]. Известно, что при инъекционном введении пик концентрации

определяется в течение первой минуты, с дальнейшим быстрым снижением без кумуляции и возвращением её уровня к фоновым значениям вследствие метаболизма до воды и углекислого газа. При этом для развития механизма антиоксидантной защиты в некоторых случаях рекомендуется увеличивать концентрацию потребляемого лекарственного средства, что может вызвать некоторые осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта. Поэтому создание новой лекарственной формы кислоты янтарной с улучшенными биофармацевтическими свойствами является актуальной задачей.

Целью настоящего исследования является разработка липосомальной лекарственной формы кислоты янтарной с экстрактом прополиса.

Материалы и методы исследования

Кислота янтарная (ФСП 42-009-00), лецитин яичный (ТУ-6-09-001-870); Экстракт прополиса 10%, полученный методом перколяции с использованием спирта этилового 70%.

Для получения липосомальной суспензии (из расчета на 10 лекарственных форм) 5 г яичного лецитина растворяли в диэтиловом эфире при постоянном перемешивании на шейкере в течение 10 минут, эфир выпаривали на роторном испарителе под вакуумом на водяной бане при 37°C до образования липидной пленки, которую затем сушили в течение 2 ч при комнатной температуре. Полученную фосфолипидную пленку гидратировали 10 мл раствора, содержащего 1 г кислоты янтарной. Раствор взбалтывали в течение 1 часа на шейкере, затем добавляли 2 мл экстракта прополиса и продолжали перемешивание в течение 2 часов. Для получения малых однослойных липосом использовали экстракционный метод, продавливая дисперсии липосом через мембранные фильтры «Nuclepore» (Whatman, Великобритания) с диаметром пор 400 нм по 20 раз с применением ручного мини-экструдера (Avanti Mini-Extruder, США). Полученный продукт представлял собой дисперсию липосом в воде.

Для определения степени включения кислоты янтарной к 10 мл липосомальной формы (точная навеска) прибавляли 10 мл раствора натрия хлорида 2 М, нагревали на водяной бане в течение 10 минут для получения гомогенного раствора, а затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут до полного осаждения липосом. Надосадочную жидкость помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 10 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида, растворяли невключившуюся кислоту янтарную. Объем раствора доводили до метки 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида, хорошо перемешивали. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре СФ-56 в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. Параллельно проводили такое же определение с раствором РСО кислоты янтарной.

Определение антиоксидантной активности проводили в опытах *in vitro*. В качестве объекта исследования использовали кровь доноров мужского пола в возрасте 20–25 лет. Для предотвращения активации нейтрофилов во время выделения проводили все манипуляции при 4°C. Использовали фиколл-урографин $\rho = 1,077$ и $\rho = 1,119$ г/см³. Вначале создавали двойной градиент фиколл-урографина: первым в пробирку вносили раствор фиколл-урографина, имеющий плотность $\rho = 1,119$ г/см³, затем на него аккуратно наслаивали раствор фиколла с плотностью $\rho = 1,077$ г/см³. Гепаринизированную кровь наслаивали на двойной градиент фиколл-урографина, центрифугировали 45 мин при 3000 об/мин. После центрифугирования получали кольца мононуклеарных клеток (верхнее) и нейтрофилов (НФ) (нижнее). Полученное кольцо мононуклеарных клеток удаляли, нейтрофильное кольцо отбирали и переносили в чистую пробирку, содержащую среду, свободную от ионов Ca²⁺ и Mg²⁺. Клетки дважды отмывали, центрифугируя 10 мин при 1500 об/мин. Количество НФ в клеточной суспензии подсчитывали в камере Горяева с использованием прижизненной окраски раствором метиленового синего в кислоте уксусной 3%. Для достижения концентрации 5·10⁶ НФ/мл клеточную суспензию разводили раствором Хенкса [1].

Определение пероксида водорода в НФ проводили спектрофотометрически по методу A. Pick и Y. Keisari с использованием раствора фенолового красного 0,2% [5]. Метод основан на способности пероксида водорода образовывать неидентифицированный продукт. Для этого к 1,64 мл фосфатного буферного прибавляли 30 мкл раствора фенолового красного и 600 мкл суспензии нейтрофилов. В опытный образец вносили липосомальную лекарственную форму. В раствор сравнения вместо испытуемого лекарственного средства добавляли воду очищенную. Пробирки инкубировали при 37°C в течение 60 минут, а затем реакцию останавливали введением в реакционную смесь 20 мкл 1 М раствора натрия гидроксида. Интенсивность светопоглощения определяли на спектрофотометре СФ-56 в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. Измерение проводили против контрольной пробы, в которой реакция была остановлена сразу после добавления красителя.

Определение активности каталазы в НФ проводили по реакции с аммония молибдатом. Для этого в опытную пробирку отмеряли 2 мл свежеприготовленного 0,03% раствора перекиси водорода, 100 мкл выделенной суспензии нейтрофилов и раствор липосом. В пробирку сравнения вместо раствора лекарственного средства прибавляли в том же объеме воду очищенную. В контрольный раствор отмеряли 2,1 мл воды очищенной и 100 мкл суспензии нейтрофилов. В качестве холостой пробы использовали раствор, состоящий из 2 мл 0,03% раствора пероксида водорода и 0,2 мл воды очищенной. Подготовленные таким образом растворы инкубировали при 37°C в течение 10 минут, а затем в каждую пробирку добавляли по 1 мл 4% раствора аммония молибдата. Интенсивность окраски измеряли при 410 нм против контрольной пробы [4].

Определение малонового диальдегида, реагирующего с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов) проводили в фосфолипиде, в липосомах с кислотой янтарной и липосомах с кислотой янтарной и экстрактом прополиса по методике. К 50 мкл суспензии липосом добавляли 450 мкл раствора тиобарбитуровой кислоты (2,5 мг/мл) в 2% ортофосфорной кислоте. Полученный раствор инкубировали при 100°C в течение 1 часа и затем после добавления 500 мкл спирта этилового 96% регистрировали спектр в диапазоне 450–650 нм.

Содержание ТБК рассчитывали по формуле

$$C = 0,81 + 106 (A_{535} - A_{580}).$$

Результаты исследования и их обсуждение

Было установлено, что полученные липосомы характеризуются степенью включения кислоты янтарной 58,5%. Для увеличения этого показателя нами была предпринята попытка введения крипротектора совместно с введением кислоты янтарной. Установлено, что максимальное включение (69,7%) наблюдается при использовании 0,2% раствора сахарозы. Для повышения стабильности и достижения максимального включения кислоты янтарной нами предложено использовать сочетание фосфолипида с холестерином.

Введение холестерина совместно с лецитином повышает прочность липосомальной мембраны за счет ограничения подвижности жирнокислотных цепей фосфолипида. Установлено, что при соотношении 1:0,2 наблюдается максимальный эффект включения кислоты янтарной (около 80%).

В процессе хранения липосом и препаратов, полученных на их основе, наблюдается окисление липидов с образованием малонового диальдегида и гидроперекисей липидов, а также увеличивается содержание непредельных группировок в липидах. Подобные изменения напрямую отражаются на стабильности липосомальной мембраны и могут приводить к снижению времени сохранения целостности мембраны и разрушению липосомального препарата. Введение в препарат стабилизирующих добавок может как ингибировать процесс окисления, так и ускорять его.

Полученные образцы инкубировались при температуре 37°C. На 1, 2, 6, 10 сутки производился забор образцов в объеме 1 мл, хранившихся до экспериментов в морозильной камере при -20°C, в которых определяли ТБК-продукты. Результаты представлены в табл. 1.

Было установлено, что присутствие в качестве антиоксиданта кислоты янтарной препятствует образованию продуктов окисления липидов, а введение в качестве действующего вещества экстракта прополиса способствует потенцированию антиоксидантного эффекта.

Для подтверждения этой гипотезы в опытах *in vitro* определили содержание перекиси водорода в нейтрофилах и активность каталазы в условиях применения липосомальной лекарственной формы.

Определение активности каталазы проводили при введении водного раствора кислоты янтарной в форме субстанции, раствора, полученного при растворении капсулы с кислотой янтарной и липосомальной лекарственной формы с кислотой янтарной. Для этого мы проводили эксперимент в фосфатном буфере сразу, через 1, 2, 6 часов после приготовления.

Установлено, что растворы субстанции кислоты янтарной в течение времени разлагаются и активность каталазы уменьшается. Более стабильными являются капсулированные формы кислоты янтарной, а также липосомальная лекарственная форма.

Таблица 1

Результаты определения ТБК-продуктов

Образец	Концентрация малонового альдегида, нмоль/л			
	1 сутки	2 сутки	6 сутки	10 сутки
Смесь лецитина с холестерином	6,8	6,83	7,14	8,16
Липосомы с кислотой янтарной	5,86	5,88	5,94	6,03
Липосомы с кислотой янтарной и экстрактом прополиса	5,7	5,73	5,81	5,83

Таблица 2

Влияние кислоты янтарной на активность каталазы в опытах *in vitro*

Время	Активность каталазы в интактных нейтрофилах, мкат/л	Активность каталазы в нейтрофилах в присутствии водного раствора кислоты янтарной, мкат/л	Активность каталазы в нейтрофилах в присутствии раствора кислоты янтарной (субстанция в капсуле), мкат/л	Активность каталазы в нейтрофилах в присутствии липосомальной формы кислоты янтарной, мкат/л
Сразу	0,7753 ± 0,027	0,8052 ± 0,049	0,8227 ± 0,035	0,8335 ± 0,017
Через 1 час после приготовления		0,7991 ± 0,037	0,8114 ± 0,044	0,8314 ± 0,031
Через 2 часа после приготовления		0,7968 ± 0,031	0,7993 ± 0,041	0,8214 ± 0,026
Через 6 часов после приготовления		0,7686 ± 0,015	0,7887 ± 0,036	0,8176 ± 0,027

Аналогичные результаты были получены при исследовании концентрации пероксида водорода. Показатель оптической плотности в интактных нейтрофилах был выше данного показателя в образцах, содержащих кислоту янтарную. Было установлено, что при 600 нм величина оптической плотности раствора сравнения составила около 1,2 единиц оптической плотности (е.о.п.), в то время как введение кислоты янтарной значительно понижает данный показатель. Так, спектр поглощения испытуемых образцов, содержащих кислоту янтарную (субстанция и лекарственные формы), характеризовался величиной оптической плотности 0,93–0,98, что свидетельствовало о снижении концентрации пероксида водорода в нейтрофилах.

Выводы

1. Разработана технология получения липосомальной лекарственной формы с кислотой янтарной и экстрактом прополиса.
2. Установлено, что введение раствора сахарозы, а также холестерина способствует увеличению степени включения кислоты янтарной до 80 %.
3. Установлено ингибирование малонового альдегида в присутствии кислоты янтарной и экстракта прополиса.
4. В опытах *in vitro* показан антиоксидантный эффект кислоты янтарной и ее лекарственных форм.

Список литературы

1. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. – Екатеринбург, 2001. – 279 с.
2. Изучение антимикробной активности некоторых двухосновных карбоновых кислот в сочетании с прополисом / Ю.С. Шишкова, Е.В. Симонян, О.С. Абрамовских и др. – Медицинский альманах. – № 1, 2014. – С. 99–101.
3. Коваленко, А.Л. Фармакологическая активность янтарной кислоты и ее лекарственные формы / А.Л. Коваленко, Н.А. Белякова, М.Г. Романцов, Л.С. Алексеева // Врач. – 2000. – № 4. – С. 26–27.
4. Немцова Е.Р. Принципы и методологические аспекты разработки и изучения антиоксидантных средств для онкологической клиники: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2006. – 47 с.
5. Pick A, Keisari Y. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages // Cell Immunol. – 1981 Apr. – № 59 (2). – P. 301–318.

References

1. Dolgushin I.I., Buharin, O.V. Neitrofilij i gomeostaz. Ekaterinburg, 2001, 279 p.
2. SHishkova Y.S., Simonjan E.V., Abramovskih O.S. i dr., Medicinskii almanah., 2014, no 1, pp. 99–101
3. Kovalenko A.L., Belyakova N.A., Romantsov M.G., Alekseeva P.S. Doctor [Vrach], 2000, no. 4, pp. 26–27.
4. Nemcova E.R. Principy i metodologicheskie aspekty razrabotki i izuchenija antioksidantnyh sredstv dlja onkologicheskoi kliniki, Avtoref. diss. dokt. biol. nauk. M., 2006. 47 p.
5. Pick A., Keisari Y. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages. Cell Immunol. 1981 Apr; 59 (2): 301–318.

Рецензенты:

Лиходед В.А., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации, ГБОУ ВПО ЮУГМУ, г. Челябинск;

Синицкий А.И., д.м.н., доцент кафедры химии фармацевтического факультета, ГБОУ ВПО ЮУГМУ, г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 06.03.2015.