

Изучение совместимости некоторых противотуберкулезных препаратов с системой радикальной полимеризации

The study of compatibility of some antituberculosis drugs with the system of radical polymerization

Жапарова Л.Ж.¹, Тажбаев Е.М.¹, Буркеев М.Ж.¹, Али С.И.², Ван Херк А.М.²

¹Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова (e-mail: lyazzh@mail.ru);

²Эйнховенский технологический университет, Нидерланды (e-mail: A.M.v.Herk@tue.nl)

Радикалды полимерлену жүйесінің туберкулезге қарсы кейбір препараттардың тұрақтылығына әсерін зерттеу нәтижелері берілген. Үлгі мономер ретінде стирол пайдаланылды. Зерттелген дәрілік препараттардың ішінде радикалдар әсеріне ең тұрақты дәрілік зат — капреомицин сульфаты екендігі анықталды. *n*-Аминосалицил қышқылы радикалды полимерлену жағдайларымен үйлесімді емес. Дәрілік заттың полимердің физика-химиялық сипаттамаларына әсері зерттелді. Полимерлену ортасында дәрінің болуы өлшемдері бойынша кіші бөлшектердің және молекулалық массасы жоғары полимердің түзілуіне әкелетіні дәлелденді.

The results of the study of the influence of radical polymerization system on stability of some antituberculosis drugs are given. Styrene was used as a model monomer. It was found out that among the drugs investigated the most stable drug to the effect of radicals is capreomycin sulfate whereas *p*-aminosalicylic acid is not compatible with radical polymerization conditions. The influence of the drug on physicochemical characteristics of polymer was investigated. It was revealed that the presence of drug in the polymerization medium leads to the formation of polymer with smaller particle size and higher molecular weight.

Актуальной на сегодняшний день является проблема терапии туберкулеза, так как лечение этого заболевания требует интенсивной терапии с применением больших доз лекарств в течение длительного времени. Несмотря на широкий спектр существующих противотуберкулезных препаратов, комбинации различных лекарственных средств (отличающихся по структуре и механизмам действия), используемых при интенсивном лечении, оказывают значительное токсическое действие на организм в целом и приводят к развитию множественной лекарственной устойчивости. Так как большинство противотуберкулезных препаратов имеют белковую структуру, их период полураспада обычно очень короткий (*n*-аминосалициловая кислота (ПАСК) — 45–60 мин, амикацин — 2–3 ч, стрептомицин — 5–6 ч и капреомицина сульфат (КС) — от 3-х до 6-ти часов), т.е. они быстро выводятся из организма, следовательно, такие лекарства необходимо вводить внутримышечно как минимум 2 раза в день. Также в связи с достаточно быстрым метаболизмом в организме большинства современных противотуберкулезных препаратов только небольшая их часть оказывает полезное действие. Поэтому необходимы новые подходы для решения этой проблемы. Внимание ученых в настоящее время сконцентрировано на создании полимерных липосом и/или везикул, наполненных лекарством [1], аэрозольных частиц для прямого введения в легкие человека [2], а также лекарственных форм в виде гранул с целью повышения эффективности действия существующих противотуберкулезных препаратов [3]. Заслуживает внимания, на наш взгляд, разработка новых форм для транспорта противотуберкулезных препаратов в виде полимерных наночастиц (НЧ) и нанокапсул, которая позволила бы обеспечить пролонгированное высвобождение лекарства поддержанием эффективной концентрации лекарственного вещества в крови в течение заданного промежутка времени, снизила бы побочные действия лекарства, таким образом повышая его терапевтический эффект [4–6].

В лаборатории профессора Й.Кройтера (университет им. И.Гете, Германия) в течение ряда лет ведутся исследования по созданию наноносителей на основе природных и синтетических полимеров. Основное внимание ученых университета им. Гете сконцентрировано на создании препарата, эффективного в борьбе с опухолью головного мозга. Под руководством профессора Й.Кройтера совместно с научной группой С.Э.Гельпериной (Московская государственная академия тонкой химической технологии, Россия) было доказано эффективное преодоление гемато-энцефалического барьера полибутилцианоакрилатными наночастицами, покрытыми полисорбатом 80, с сорбированными веществами, в свободной форме не проникающими в мозг [7]. С.Э.Гельпериной и ее сотрудниками также исследована возможность включения противотуберкулезных препаратов I ряда — изониазида, рифампицина

и стрептомицина в полибутил- и полиизобутилцианоакрилатные НЧ [8]. Авторами работы [9] сделана попытка создания наносомальных форм для рифампицина, изониазида и пиразинамида в виде аэрозолей. Во всех трех случаях содержание иммобилизованного лекарства в НЧ составляло более 40 %. Ими исследован химиотерапевтический потенциал этих препаратов при применении их в виде аэрозолей, отмечены достаточно высокая эффективность и экономичность использования таких форм при лечении микобактерий туберкулеза [9]. Этими же учеными изучен характер доставки наночастицами рифампицина, изониазида, пиразинамида и этамбутола, полученных на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, в мозг [10]. Оценен значительный потенциал использования полимерных НЧ по сравнению со стандартными препаратами [10]. С.М. Johnson с сотрудниками исследована эффективность использования противотуберкулезных препаратов, инкапсулированных в НЧ полимолочной кислоты, в терапии туберкулеза [11]. Показано пульсирующее действие препаратов при применении полимерных НЧ.

Одним из наиболее широко распространенных методов получения полимерных НЧ является эмульсионная полимеризация, поскольку она дает возможность получить продукт с довольно высоким выходом и удовлетворительными характеристиками. Известно немало примеров получения полимерных НЧ и нанокapsул в эмульсии с их последующей иммобилизацией лекарственным препаратом. Недостатком этого метода является низкое содержание лекарственного вещества в носителе. Наиболее эффективным способом включения лекарства в полимерные НЧ может быть добавление его в реакционную среду непосредственно в процессе полимеризации. Поскольку некоторые лекарственные препараты весьма чувствительны к условиям внешней среды, необходимо учитывать, что агрессивная среда полимеризации может повлиять на устойчивость лекарства. В связи с этим актуальным является исследование влияния процесса радикальной полимеризации в эмульсии на устойчивость лекарственного вещества.

Задачей данного исследования являлось изучение совместимости некоторых лекарственных препаратов, применяемых в терапии туберкулеза, с условиями получения НЧ в процессе радикальной полимеризации. Структуры противотуберкулезных препаратов, использованных в данной работе, приведены на рисунке 1.

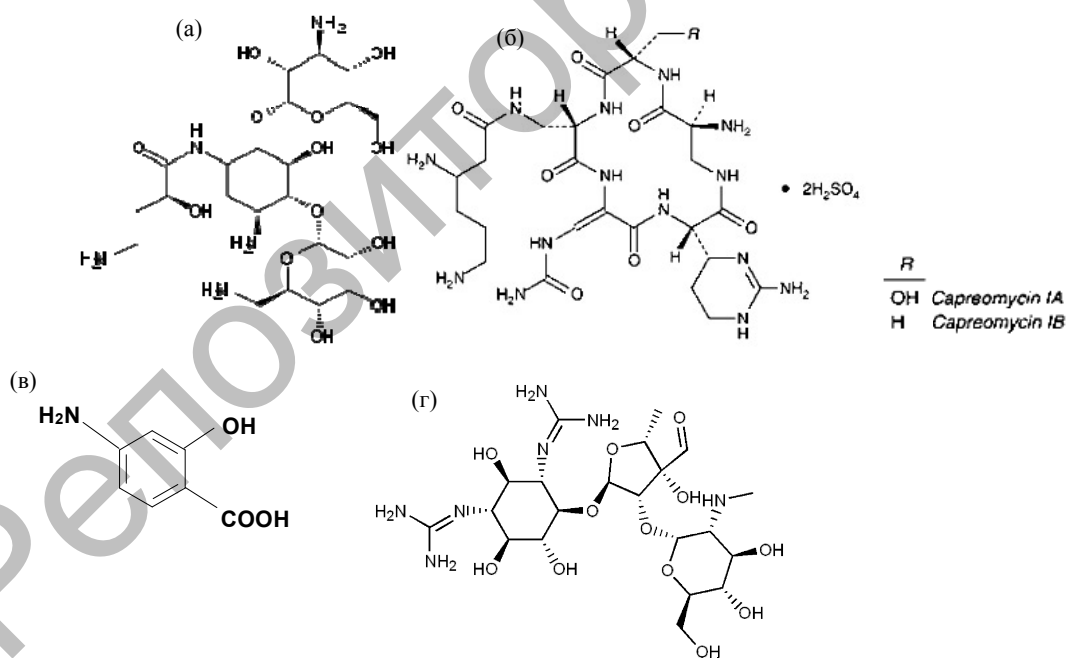


Рис. 1. Структурная формула лекарств: (а) — амикацин; (б) — капреомицина сульфат; (в) — *p*-аминосалициловая кислота; (г) — стрептомицин

Экспериментальная часть

Материалы. Стирол (Merck, >99 %), додецилсульфат натрия и гексадецилтриметиламмония бромид, а также все инициаторы поставлены фирмой Sigma Aldrich (Германия) и использованы без предварительной очистки.

Получение полистирольных НЧ. Имобилизованные лекарственными препаратами НЧ были получены эмульсионной полимеризацией стирола в присутствии лекарства с использованием следующих соотношений: стирол (2 %), ПАВ (5 % от массы мон.), мон. : лекарство = 1:1. Раствор лекарства при перемешивании добавляли в дисперсную систему, содержащую ПАВ и мономер. Затем в систему добавляли инициатор и нагревали до 60 °С. Реакция длилась 8 часов.

Характеристика полистирольных НЧ

Фотонная корреляционная спектроскопия

Средний диаметр НЧ и полидисперсность измеряли на приборе Zetanano (Malvern Instruments) при 25 °С и под углом 173°.

Гель-проникающая хроматография

НЧ сушили в вакууме при температуре 45 °С до постоянной массы, затем растворяли в тетрагидрофуране. Измерения проводили на приборе SEC 3 («Alliance») WAT270886 Waters 2695 с использованием полистирольных стандартов.

Результаты и их обсуждение

При получении НЧ, иммобилизованных лекарственным препаратом, введение лекарственного вещества непосредственно в реакционную среду способствует увеличению содержания лекарства в НЧ, однако необходимо учитывать ряд проблем, возникающих при этом, например: стабильность данного лекарственного препарата в полимеризационной среде в процессе реакции, его совместимость с компонентами системы и др. Известно, что радикалы, образующиеся в результате распада инициатора, могут повлиять на стабильность лекарства и привести к изменению его структуры уже на начальной стадии процесса, в то время как лекарственное вещество также может оказать влияние на ход реакции, например, прореагировав с радикалами инициатора, привести к ингибированию полимеризации. Для выявления данного эффекта проведена эмульсионная полимеризация в присутствии лекарства и без него, с использованием стирола в качестве модельного мономера. В реакциях с лекарством применяли *n*-аминосалициловую кислоту. В качестве радикалообразующего инициатора применяли индифферентный в биологической среде персульфат калия, а в качестве стабилизатора — один из широко распространенных ПАВ, используемый при получении полимерных НЧ, эмульгатор — натрия додецилсульфат.

Нами проведен эксперимент с использованием названных выше компонентов в присутствии лекарственного препарата ПАСК. Установлено, что присутствие ПАСК деструктивно влияет на процесс эмульсионной полимеризации стирола. Так, после добавления лекарства в реакционную среду, содержащую стирол, эмульгатор, инициатор, и нагревания до 60 °С визуально наблюдалось изменение цвета раствора от молочно-белого до темно-коричневого. Одной из причин этого явления могут быть деструкция лекарственного препарата при нагревании до температуры реакции и взаимодействие продуктов распада с радикалами инициатора. В связи с этим нами изучена стабильность данного лекарственного препарата при температуре реакции. Лекарство нагревали до 60 °С в течение 1 часа и подвергали УФ-облучению. Устойчивость лекарственного препарата к нагреванию контролировали по изменению характерных полос поглощения лекарства в УФ-области (рис. 2).

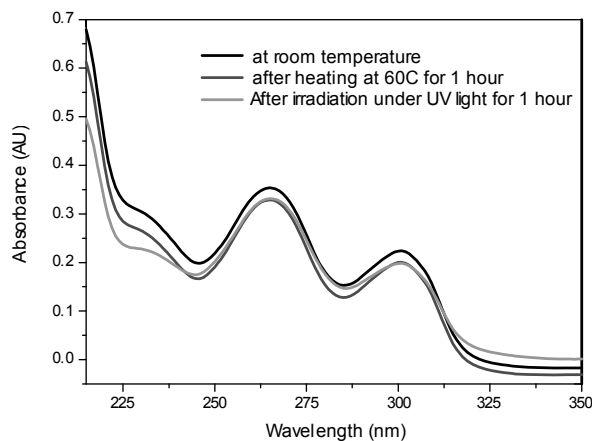


Рис. 2. УФ-спектр ПАСК до и после нагревания, а также после обработки УФ-светом

Представленные на рисунке 2 спектральные характеристики лекарственного препарата до обработки, после нагревания и облучения идентичны, что свидетельствует об устойчивости лекарства к нагреванию и влиянию УФ-света.

Возможно, что не продукты распада, а само лекарство вступило во взаимодействие с инициатором, в роли которого выступает сильный окислитель — персульфат калия. Для расширения области исследования нами рассмотрены 4 комбинации лекарственного вещества и инициатора: лекарства — ПАСК, амикацин, стрептомицин и КС; инициаторы — персульфат калия, 4,4'-азобис(4-цианопентановая кислота) (V-501), 2,2'-азобис(2-метилпропионамидина)дигидрохлорид (V-50) и фотоинициатор (2-гидрокси-4'-(гидроксиэтокси)-2-метилпропиофенон). Результаты визуального наблюдения за продуктами эмульсионной полимеризации — растворов лекарственных препаратов и инициаторов — приведены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Результаты эксперимента взаимодействия лекарств с инициаторами

Лекарство	Инициатор			
	Персульфат калия	V-501	V-50	Фотоинициатор
ПАСК	Раствор темно-коричневого цвета (даже без нагревания)	Раствор темно-коричневого цвета	Раствор темно-желтого цвета	Раствор светло-коричневого цвета
Амикацин	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Раствор с еле заметным коричневым оттенком
Стрептомицин	Без изменений	Раствор светло-желтого цвета	Без изменений	Раствор с еле заметным коричневым оттенком
КС	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Без изменений

Исследование продуктов взаимодействия лекарственных препаратов и инициаторов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволило сделать следующие выводы:

- ПАСК реагирует со всеми инициаторами. Это лекарство несовместимо с условиями радикальной полимеризации;
- КС — самое стабильное лекарство для тестируемых инициаторов, так как не взаимодействует с данными инициаторами;
- амикацин стабилен в присутствии следующих инициаторов: персульфата калия, V-501, V-50;
- стрептомицин инертен к действию персульфата калия и V-50;
- фотоиницирование подходит только для КС.

Комбинация лекарства с инициатором «Капреомицина сульфат — персульфат калия» выбрана как наиболее оптимальная. Однако эмульсионная полимеризация в присутствии капреомицина сульфата с использованием персульфата калия в качестве инициатора в полимеризации стирола желаемых результатов не дала: полимер не образовался. Возможно, это вызвано присутствием в системе анионного ПАВ (додецилсульфата натрия) вместе с положительно заряженными ионами лекарства (КС). Следовательно, при выборе условий необходимо учитывать не только взаимодействие лекарственного препарата с инициатором, но и совместимость его с ПАВ. Возможно, для данной системы более приемлемо использование не анионного, а катионного ПАВ — гексадецилтриметиламмония бромида. В результате использования такой комбинации реагирующих компонентов получены полимерные НЧ с удовлетворительными характеристиками. Ниже приведены результаты реакций полимеризации стирола с лекарством и без него (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Характеристика полистирола с лекарством и без него

Полимер	Средний размер частиц, d , нм	Полидисперсность	M_n	M_w/M_n	Конверсия, %
С лекарством	173	0,2	54500	5,652	99
Без лекарства	400	0,4	9900	11,231	96

Из данных, приведенных в таблице 2, можно сделать вывод о том, что лекарство влияет как на размер частиц, так и на молекулярную массу образовавшегося полимера. При этом присутствие лекарства в системе значительно улучшает физико-химические характеристики продукта: образуется

полимер с более высокой молекулярной массой, а средний размер частиц уменьшается до 173 нм. Кроме того, полученный продукт обладает более узким распределением частиц по размерам по сравнению с полимером без лекарства. Наряду с этим данные, полученные методом газовой хроматографии, свидетельствуют о повышении степени превращения мономера в полимер.

Таким образом, в работе показана возможность включения в полимерные носители лекарственного препарата непосредственно на стадии синтеза полимерных НЧ. Найдена оптимальная комбинация реагирующих компонентов для получения НЧ, иммобилизованных противотуберкулезным препаратом — капреомицина сульфатом.

References

1. *Giovagnoli S., Blasi P., Vescovi C. et al.* Unilamellar vesicles as potential capreomycin sulfate carriers: Preparation and Physicochemical Characterization // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* — 2003. — Vol. 4. — № 4. — P. 1–12.
2. *Tsapis N., Bennett D., O'Driscoll K. et al.* Direct lung delivery of para-aminosalicylic acid by aerosol particles // *Tuberculosis.* — 2003. — 83. — P. 379–385.
3. *Charles A.P., Shaun E.B., Gwen A.H. et al.* Once-daily and twice-daily dosing of *p*-aminosalicylic acid granules // *American Journal of Respiratory and Critical care medicine.* — 1999. — Vol. 159. — P. 932–934.
4. *Kreuter J.* Nanoparticles; Colloidal Drug Delivery Systems. — New-York: Marcel Dekker, 1994.
5. *Chavany C., Le Doan T., Couvreur P. et al.* Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides // *Pharm. Research.* — 1992. — Vol. 9. — № 4. — P. 441–449.
6. *Watanasirichaikul S., Davies N.M., Rades T. et al.* Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions // *Pharm. Research.* — 2000. — Vol. 17. — № 6. — P. 684–689.
7. *Petri B., Bootz A., Khalansky A. et al.* Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants // *J. Control. Release.* — 2007. — Vol. 117. — № 1. — P. 51–58.
8. *Anisimova Y.V., Gelperina S.I., Peloquin C.A. et al.* Nanoparticles as antituberculosis drugs carriers: effect on activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocyte-derived macrophages // *J. of Nanoparticle Research.* — 2000. — № 2. — P. 165–171.
9. *Pandey R., Sharma S., Khuller G.K.* Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy // *Tuberculosis.* — 2005. — 85. — P. 415–420.
10. *Pandey R., Khuller G.K.* Oral nanoparticle-based antituberculosis drug delivery to the brain in an experimental model // *J. of Antimicrobial Chemotherapy.* — 2006. — № 4. — P. 1–7.
11. *Johnson C.M., Pandey R., Sharma S. et al.* Oral Therapy Using Nanoparticle-Encapsulated Antituberculosis Drugs in Guinea Pigs Infected with *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* — 2005. — Vol. 49. — № 10. — P. 4335–4338.