

ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ПРОСПИДИНА С ГЕЛЕОБРАЗУЮЩИМ БЫСТРОНАБУХАЮЩИМ ФОСФАТОМ ДЕКСТРАНА

**Т.Л. Юркштович, С.О. Соломевич, П.М. Бычковский, Н.В. Голуб, В.А. Алиновская,
Р.И. Костерова, А.А. Кладиев**

*Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский
институт физико-химических проблем», Минск, Республика Беларусь*

e-mail: sergejsolomevich@yandex.ru

Введение

Практически все применяемые в медицинской практике противоопухолевые лекарственные средства имеют ряд недостатков, к которым, прежде всего, следует отнести высокую токсичность, быстрое выведение из кровяного русла и невозможность создания эффективной концентрации в органе-мишени. Возможным решением существующих проблем является создание пролонгированных форм противоопухолевых препаратов, обеспечивающих не только повышение срока воздействия, но и адресную доставку цитостатиков в организм.

В настоящей работе д

ля создания системы с контролируемым высвобождением активного вещества, в частности, для локальной химиотерапии канцероматоза брюшины, был выбран противоопухолевый препарат проспидин [1], преимуществами которого по сравнению с другими цитостатиками являются наличие противоопухолевого действия при местном применении и низкие параметры токсичности [2]. Проспидин используется для лечения большого количества опухолевых локализаций (лечение рака гортани, кожных ретикулезоз, рака мочевого пузыря, рака кожи и других видов злокачественных новообразований), хотя и демонстрирует разную степень активности, что связано с быстрым выведением цитостатика из организма, препятствующим достижению его максимального лечебного действия.

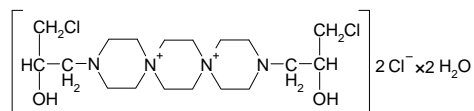
В качестве гелеобразующего полимера для пролонгирования действия проспицина в работе использовали фосфат декстрана (ФД), который обладает иммуномодулирующей активностью, способностью к биодegradации, катионообменными, комплексообразующими свойствами, собственной противоопухолевой активностью и возможностью использования при продолжительном лечении [3, 4].

Целью данной работы являлось исследование закономерностей сорбции проспицина из его водных растворов образцами фосфатов декстрана с различной степенью набухания и определение механизмов сорбционных взаимодействий.

Методы исследования

В работе использовали образцы ФД, полученные модификацией декстрана (молекулярная масса 60 кДа) ортофосфорной кислотой в расплаве мочевины при различных соотношениях реагентов и времени процесса этерификации, остаточном давлении 0,05÷0,50 атм. и температуре 125±1°C [5, 6]. Полученные в данных условиях полисахариды содержат в своем составе фосфорнокислые и карбаматные группы, что подтверждено результатами элементного анализа, потенциметрического титрования и данными ИК-спектроскопии [3]. Содержание фосфора (C_P) и азота (C_N) в образцах фосфатов декстрана (ФД) определяли согласно методикам [7] и [8], соответственно. Потенциметрическое титрование образцов ФД в Н-форме проводили 0,1 н раствором NaOH на фоне ионной силы раствора 0,05 [9].

Субстанция Проспиция хлорид (РУП «Унитехпром БГУ»), далее проспидин, имеет следующую химическую формулу:



ИК-спектры образцов регистрировали на инфракрасном спектрофотометре Thermo Nicolet FT-IR Nexus методом прямого прессования с бромидом калия.

Степень набухания (Q) ФД определяли гравиметрическим методом [6].

Физико-химические характеристики образцов гелеобразующих ФД, используемых в качестве сорбентов проспирина, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика гелеобразующих фосфатов полисахаридов

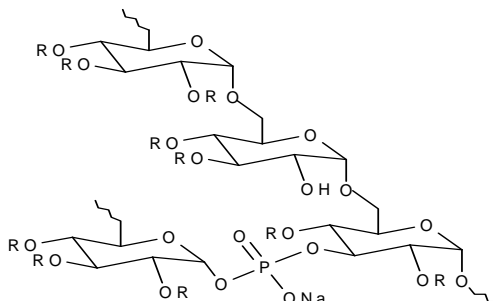
№	Образец	Противо-ион	Q, г/г	C_p , ммоль/г	C_N , ммоль/г	ОЕ ₁ , мг-экв/г	ПОЕ, мг-экв/г	pK ₁	pK ₂
1	ФД ₁	Na ⁺	155,0	2,0	1,9	1,8	3,4	2,7	7,3
2		H ⁺	160,0						
3	ФД ₂	Na ⁺	78,0	2,3	1,9	2,3	4,1	2,6	7,2
4		H ⁺	80,0						

Примечание: ОЕ₁ – обменная емкость по первой группе однозамещенного фосфата; ПОЕ – полная обменная емкость ФД; pK₁ и pK₂ – кажущиеся константы диссоциации по первой и второй ступеням однозамещенного фосфата.

Сорбцию проспирина ФД изучали в статических условиях при температуре 298±0,5 К, соотношении массы сорбента к объему водного раствора сорбата 1 : 250 в течение времени, достаточного для установления равновесия (согласно предварительным данным сорбционное равновесие достигается практически за первые 15 минут контакта ФД с раствором цитостатика). Равновесные фазы разделяли фильтрованием на стеклянном фильтре с размером пор 40 мкм. Количество сорбированного проспирина рассчитывали по разности его концентрации в исходном и равновесном растворах, учитывая изменение объема в результате набухания ФД. Концентрацию проспирина во внешнем растворе определяли методом неводного титрования [11]. Ионообменную составляющую сорбции ($\bar{c}_{pr,u}$) определяли потенциометрически, количество необменно поглощенного проспирина ($\bar{c}_{pr,p}$) определяли по разности общего количества сорбированного цитостатика и ионообменной составляющей сорбции.

Результаты и обсуждение

Ранее [3] нами было установлено, что фосфорилируемые в указанных условиях полисахариды характеризуются трехмерной структурой за счет образования двухзамещенных фосфорнокислых групп, обуславливающих сшивку макромолекулярных цепей. О наличии одно- и двухзамещенных фосфатов в ФД₁ и ФД₂ свидетельствуют численные значения ПОЕ и C_p (см. таблицу): для обоих образцов ПОЕ < 2 C_p , в то время как при образовании исключительно однозамещенных фосфорнокислых групп должно соблюдаться соотношение ПОЕ ≈ 2 C_p . Таким образом, строение исследуемых ФД можно представить в следующем виде:



где R = H, PO(OH)₂, CONH₂.

Одним из основных параметров, характеризующих структуру гидрогелей, является степень набухания в воде. Согласно уравнению Флори-Ренера [10], связывающего

равновесное набухание с концентрацией узлов сетки, с увеличением степени сшивки гидрогелей равновесная степень набухания уменьшается.

Из представленных на рисунке 1 кинетических кривых набухания гидрогелей ФД₁ и ФД₂ в воде видно, что время достижения равновесной степени набухания составляет ≈15 минут, причем степень сшивки образцов ФД влияет не на скорость поглощения раствора, а только на предельную величину степени набухания. Это позволяет отнести исследуемые гидрогели к классу макропористых [12].

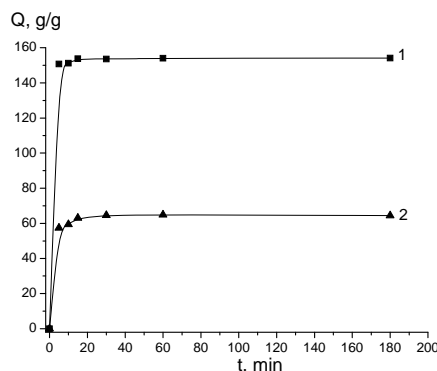


Рисунок 1 – Кинетические кривые набухания образцов ФД₁ (1) и ФД₂ (2) в воде

Обращает внимание то, что образец ФД₁ характеризуется значительно более высокой степенью набухания по сравнению с ФД₂ несмотря на близкие значения ($2C_p$ – ПОЕ), составляющие 0,6 и 0,5 мг-экв/г, соответственно. Вероятно, это связано с тем, что различия в условиях синтеза обоих образцов (давление в зоне реакции, продолжительность процесса, соотношение компонентов реакционной смеси) обуславливают превалирование образования меж- или внутримолекулярных сшивок за счет двухзамещенных фосфатов. Тем не менее, высокая скорость набухания гелеобразующих ФД в воде свидетельствует о том, что иммобилизованные формы цитостатических препаратов можно готовить путем смешения компонентов непосредственно перед применением. Это имеет особенно большое значение для использования в качестве сорбата малоустойчивого в водных растворах проспидина.

Результаты изучения кинетики сорбции проспидина из его водного раствора с концентрацией 0,0009 моль/л (таблица 2) образцами гидрогелей ФД свидетельствуют не только о высокой скорости протекания сорбционного процесса, но и об уменьшении водопоглощающей способности продукта взаимодействия по сравнению с исходным ФД.

Таблица 2 – Кинетика сорбции проспидина гидрогелем ФД₁ (Н-форма)

№	Время, мин.	C_{p+2} , ммоль/г	pH	Q, г/г
1	5	0,19	3,18	121,2
2	15	0,20	3,17	120,4
3	30	0,21	3,12	118,9
4	60	0,20	3,13	119,1
5	180	0,20	3,10	118,7

С учетом особенностей строения проспидина и ФД основными типами взаимодействий, которые могут быть реализованы в данном сорбционном процессе, являются электростатические, донорно-акцепторные и гидрофобные. Подтверждением протекания ионного обмена является существенное уменьшение pH равновесных растворов по сравнению с исходными. Для выявления превалирующего типа взаимодействия нами проведено сопоставление ИК-спектров продукта сорбционного взаимодействия проспидина с ФД и аддитивной смеси ФД и проспидина (рисунок 2).

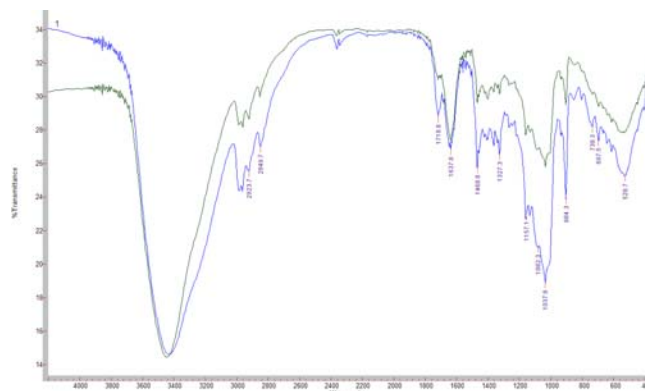
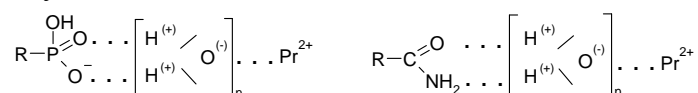


Рисунок 2 – ИК-спектры: 1 – продукт сорбционного взаимодействия ФД₁ (Na-форма) с проспидином; 2 – аддитивная смесь ФД₁ (Na-форма) и проспидина

Присутствие проспидина в продукте сорбционного взаимодействия и аддитивной смеси подтверждается появлением в ИК-спектрах полос поглощения при 2981, 2961 и 2848 см⁻¹, обусловленных валентными колебаниями С-Н в группах СН, СН₂, СН₂Сl. Наиболее характерные полосы поглощения, обусловленные наличием фосфорнокислых групп в составе фосфорилированных полисахаридов, находятся в области 540–1240 см⁻¹: 970–1050 см⁻¹ (С-О-Р), 1220–1240 см⁻¹ (Р=О). В этой же области располагаются и характерные полосы поглощения проспидина (906–1037 см⁻¹). Наложение указанных полос поглощения в продуктах взаимодействия ФД с проспидином не позволяет оценить изменение состояния фосфорнокислых групп в результате сорбции. Полоса поглощения 1714 см⁻¹ обусловлена валентными колебаниями С=О карбаматной группы. Уменьшение в ИК-спектре продукта сорбционного взаимодействия ФД с проспидином интенсивности этой полосы и сдвиг ее максимума на 13 см⁻¹ в сторону низких частот указывают на образование специфической связи между катионами проспидина и карбаматными группами ФД. Далее, максимум поглощения связанной воды в ИК-спектре продукта взаимодействия ФД с проспидином (1637 см⁻¹) сдвинут на 7 см⁻¹ по сравнению с ИК-спектром аддитивной смеси (1644 см⁻¹). На основании этого можно допустить, что взаимодействие катионов проспидина с ФД происходит через молекулы воды, сольватно связанной с цитостатиком и гидрогелем:



На рисунке 3 представлены изотермы сорбции проспидина на микрогелях ФД в Na-формах. Интервал концентраций проспидина во внешнем растворе ограничен, и это обусловлено тем, что при более высокой концентрации цитостатика для Na-формы ФД характерен фазовый переход гель-золь.

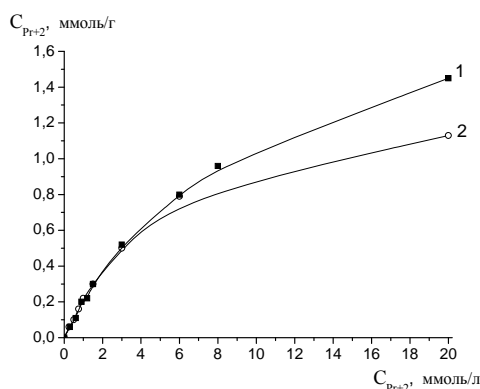
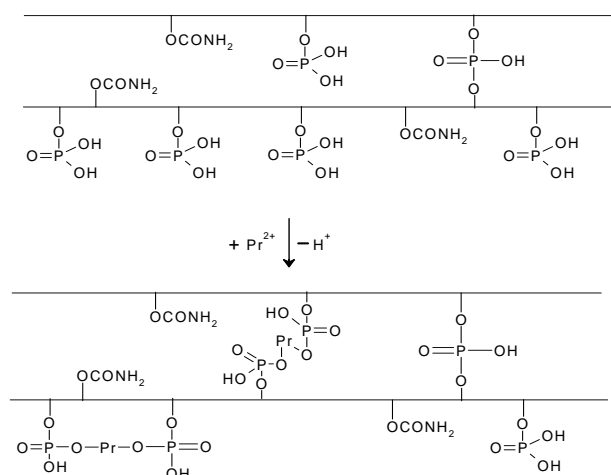


Рисунок 3 – Изотермы сорбции проспидина образцами ФД1 (1) и ФД2 (2) в Na-форме
Сорбция проспидина изученными ФД при концентрации цитостатика во внешнем растворе до 3 ммоль/л практически не зависит от степени набухания гидрогелей, и следовательно, в основном, определяется энергией взаимодействия с функциональными группами полиэлектролитов, что можно представить следующей схемой:



Расчет вклада ионообменной составляющей $(\bar{c}_{Pr})_u$ (таблица 3), сделанный на основании изменения pH среды в результате сорбции проспирина Н-формами ФД, свидетельствует о том, что предельное значение этого вклада не превышает $0,09 \div 0,10$ ммоль/г. При более высоких концентрациях цитостатика в растворе тенденция к росту поглощения проспирина ФД возрастает с увеличением степени набухания, т.е. при переходе от более к менее сшитому гидрогелю.

Степень набухания продуктов взаимодействия ФД с проспириндом уменьшается с ростом поглощенного гелем цитостатика. Это может быть вызвано как повышением эффекта экранирования отрицательного заряда ионизированных фосфорнокислых групп вследствие специфических взаимодействий органического катиона с ФД, так и дополнительной сшивкой макромолекул ФД в результате взаимодействия двухзарядных катионов проспирина с функциональными группами, принадлежащими соседним макромолекулам. Следует отметить, что по мере роста концентрации проспирина в растворе не только уменьшается степень набухания гидрогелей ФД в Н-форме, сами образцы претерпевают видимые изменения: они становятся менее прозрачными, постепенно превращаются в компактные непрозрачные микрочастицы. По-видимому, вследствие частичного экранирования отрицательного заряда ионизированных фосфорнокислых групп Н-формы ФД катионами проспирина, реализуется более компактная пространственная структура, которая стабилизируется дополнительными межмолекулярными водородными связями между фосфорнокислыми группами.

Таблица 3 – Экспериментальные данные по сорбции проспирина ФД в Н-форме с разной степенью набухания

Образец	$c_{Pr} \cdot 10^3$, моль/л	pH	$(\bar{c}_{Pr})_u$, ммоль/г	$(\bar{c}_{Pr})_p$, ммоль/г	Q, г/г
ФД ₁ (Q=160 г/г)	0,60	3,25	0,03	0,08	134,0
	0,90	3,12	0,06	0,14	119,1
	1,50	3,01	0,09	0,23	97,0
	3,00	3,03	0,09	0,40	32,4
ФД ₂ (Q=80,0 г/г)	0,50	3,37	0,04	0,05	66,7
	0,80	3,16	0,07	0,08	57,9
	1,00	3,04	0,10	0,10	50,2

Продукты взаимодействия проспирина с ФД в Na-форме сохраняют свойства гидрогелей вплоть до концентрации цитостатика во внешнем растворе $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Однако, при концентрации проспирина во внешнем растворе $> 2 \cdot 10^{-2}$ моль/л масса образцов начинает постепенно уменьшаться, что свидетельствует об протекании гель-золь перехода. Можно предположить, что тенденция к уменьшению размеров микрогелей связана с процессом распада агрегатов, образованных за счет водородных и вандерваальсовских связей между частицами ФД [13]. По-видимому, для Na-формы ФД, в фазе которой имеет место диссоциация фосфорнокислых групп не только по первой, но частично и по второй ступени,

повышение содержания проспирина в микрогелях и, следовательно, снижение степени их набухания приводит к росту плотности поверхностного заряда частиц, распаду их на более мелкие фрагменты из-за электростатического отталкивания [14].

Выводы

Таким образом, установлено:

- степень сшивки гелеобразующих ФД, полученных этерификацией полисахарида ортофосфорной кислотой в расплаве мочевины, определяет максимальную величину степени набухания в воде и не влияет на скорость этого процесса;
- сорбционный процесс проспирина образцами ФД характеризуется высокой скоростью и осуществляется, преимущественно, за счет реализации электростатических взаимодействий катионов проспирина с фосфорнокислыми группами ФД через молекулы воды, сольватно связанной с цитостатиком и функциональными группами ФД;
- сопоставимые времена достижения максимальной степени набухания в воде и равновесного состояния сорбционного процесса проспирина ФД (≈ 15 минут) предопределяют возможность получения иммобилизованной формы цитостатика путем смешения компонентов непосредственно перед применением в условиях операционной;
- уменьшение степени набухания гелеобразующих ФД в Н-форме с ростом концентрации проспирина во внешнем растворе сопровождается образованием компактной пространственной структуры, стабилизированной дополнительными межмолекулярными водородными связями между фосфорнокислыми группами. Продукты взаимодействия проспирина с ФД в Na-форме сохраняют свойства гидрогелей вплоть до концентрации цитостатика во внешнем растворе $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л, после чего наблюдается гель-золь переход.

Список литературы

1. Синтез и особенности распределения проспирина ^{14}C , меченного по диспиротрипиперазину / В.Б. Деев [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1980. – Т.14, № 1. – С. 7–10.
2. Противоопухолевая активность иммобилизованного проспирина в эксперименте in vivo / А.А. Кладиев [и др.] // Онкологический журнал. – 2012. – Т. 6, № 4. – С. 7–11.
3. Получение и противоопухолевая активность гелеобразующего препарата проспирина / П.М. Бычковский [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 7. – С. 46–51.
4. Гидрогелевый противоопухолевый препарат: пат. 2442586 Росс. Федерация, МПК А 61К 31/495. А 61К 47/36. А 61Р 35/00 / Т.Л. Юркштович [и др.]; заявитель Учреждение Белорусского государственного университета "Научно-исследовательский институт физико-химических проблем"; Общество с ограниченной ответственностью "Биотехнологическая компания ТНК". – № а 20091587; заявл.11.11.09, опубл. 20.02.12 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2011. – № 3. – С. 10.
5. Гелеобразующие смешанные фосфорнокислые и карбаматные эфиры декстрана, способ их получения : пат. 16349 Респ. Беларусь, МПК С08В 31/00, А 61К 31/715 / Т.Л. Юркштович [и др.]; заявитель НИИ ФХП БГУ, Государственное научное учреждение «Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси» – № а 20091588; заявл.11.11.09; опубл. 20.02.12 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2011. – № 3. – С. 10.
6. Голуб, Н.В. Получение, структура и свойства гидрогелей фосфатов крахмала / Н.В. Голуб [и др.] // Вестник БГУ. – 2008. – Сер. 2, № 3. – С. 29–33.
7. Бусев, А.И. Колориметрические (фотометрические) методы определения неметаллов / А.И. Бусев; под ред. А.И. Бусева. – Москва: Изд-во иностр. лит., 1963. – 219 с.
8. Houben-Weyl. Methoden der organischen chemie / Houben-Weyl. – Verlag Georg Thieme, 1953. – 1032 p.
9. Полянский, Н.Г. Методы исследования ионитов / Н.Г. Полянский, Г.В. Горбунов, Н.Л. Полянская. – Москва. – 1976. – 208 с.
10. Peppas, N.A. Hydrogels in pharmaceutical formulations / N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa // Eur. J. Pharmaceutic. and Biopharmaceutic. – 2000. – № 50. – P. 27–46.
11. Проспирин лиофилизированный 0,1 г для инъекций / Биотехнологическая компания ТНК ООО, Российская Федерация / ФГУП НПО Микроген МЗ РФ // Фармацевтическая статья ФС 42-1999-83. – Российская Федерация.
12. Ganji, F. Theoretical description of hydrogel swelling: A review / F. Ganji, S. Vasheghani-Farahani, E. Vasheghani-Farahani // Iranian Polymer Journal. – 2012. – V.19, №. 5. – P.375-398.
13. Мирончик, В.О. Биодegradуемые нано- и микрогели на основе фосфатов крахмала: получение и физико-химические свойства / В.О. Мирончик [и др.] // Тез. докл. Междунар. научно-техн. конф. «Полимерные композиты и трибология» (Поликомтриб – 2013). – 2013. – С. 87.
14. Морева, Ю.Л. Влияние электролитов NaOH, HCl, NaCl и CaCl₂ на агрегативную устойчивость водных дисперсий сульфатного лигнина по данным фильтрации через трековые мембраны / Ю.Л. Морева, Н.С. Алексеева, Ю.М. Чернобержский // Коллоидный журнал. – 2011. – Т. 73, № 3. – С. 359.