

ОРИГІНАЛЬНА СТАТТЯ

УДК 615.31:615.014

ВИВЧЕННЯ СУБСТАНЦІЇ НАНОРОЗМІРНОГО ЗАЛІЗА З МЕТОЮ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ РОЗРОБКИ КАПСУЛЬОВАНОЇ ЛІКАРСЬКОЇ ФОРМИ

Полова Ж.М., Саханда І.В.

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна

Резюме. Стаття присвячена дослідженням з фармацевтичної розробки високоєфективного препарату нового покоління на основі наночастинок заліза для профілактики і лікування залізодефіцитної анемії та анемії хронічних захворювань. Хоча сучасний ринок лікарських препаратів представлений значним арсеналом протианемійних препаратів, що характеризуються різним вмістом в них заліза та наявністю допоміжних компонентів, які впливають на фармакокінетику різних лікарських форм, але вони не в повній мірі задовольняють вимогам лікарів та пацієнтів. В роботі використані аналітичні, технологічні та біологічні методи дослідження. Розмір та форму отриманих наночастинок визначали методом трансмісійної електронної мікроскопії. В якості активного фармацевтичного інгредієнта використана субстанція наночастинок заліза модифікованих аскорбіновою кислотою, одержаних методом хімічної конденсації у водному середовищі шляхом відновлення хлориду заліза (III). Розміри наночастинок оксиду заліза визначають їх фізичні, біологічні і фармакологічні та токсикологічні властивості. Встановлено, що дана субстанція - сферичні наночастинок заліза розміром 40 нм. На підставі експериментальних даних фармацевтична розробка визначає вид лікарської форми, що забезпечує оптимальний терапевтичний ефект ліків при мінімумі побічної дії, фармакологічну раціональність, а також зручність при їх зберіганні та використанні. В результаті вивчення проблеми шляху введення препарату обрано вид лікарської форми та шлях введення - тверда форма випуску у вигляді капсул для орального застосування. Комплексне вивчення фізико-хімічних характеристик лікарської речовини на етапі розробки використовується при обґрунтуванні вибору методу оцінки ефективності та безпеки препарату. Субстанція наночастинок заліза охарактеризована за показниками біобезпечності в експериментах in vitro та in vivo. Фармацевтична розробка дає наукове обґрунтування вибору кожної допоміжної речовини, дозволеної до використання у виробництві ліків. Допоміжні речовини утворюють єдину з активним фармацевтичним інгредієнтом систему, властивості якої визначаються і спрямовані на забезпечення необхідної терапевтичної ефективності препарату, саме тому наступний етап дослідження є розробка оптимального складу твердих желатинових капсул з наночастинками заліза.

Ключові слова: наночастинок заліза, залізодефіцитна анемія, капсули, тверда лікарська форма

Вступ. Залізодефіцитна анемія (ЗДА) сьогодні за даними ВООЗ визнана однією із важливих соціальних проблем світового масштабу [1]. Вона є одним із найбільш розповсюджених патологічних станів, що зустрічаються в клінічній практиці. До основних груп ризику розвитку ЗДА відносяться жінки репродуктивного віку, вагітні жінки, діти з перших років життя. Друге місце за розповсюдженістю після ЗДА займає анемія хронічних захворювань (АХЗ) (анемія хронічного запалення). Цей вид анемії супроводжує хронічні інфекції, запальні захворювання та неопластичні процеси. Серед людей похилого віку доля АХЗ сягає 30-50%.

На даний час сучасний ринок лікарських препаратів представлений значним арсеналом протианемійних препаратів заліза, що характеризуються різним вмістом в них заліза та наявністю допоміжних компонентів, які впливають на фармакокінетику різних лікарських форм. За фор-

мою заліза існуючі препарати розділяють на дві групи: препарати солей заліза та препарати залізовмісних комплексів. Основними їх недоліками є низький рівень засвоюваності, висока частота проявів побічних ефектів, серед яких нудота, анорексія, металевий присмак у роті, запори, диспепсичні розлади, значна тривалість курсу прийому препаратів (до 2-3 місяців) для досягнення терапевтичного ефекту. Усі ці фактори значно впливають на комплаєнтність існуючих протианемійних препаратів заліза.

Саме з метою подолання вищевказаних чинників актуальним є використання активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), одержаних методами нанотехнології. Можливості нанотехнологій та матеріалів на їх основі розповсюджуються і на таку галузь фармацевтичної технології, як створення наночастинок (мікронізація) уже відомих в медичній практиці субстанцій. Така форма субстанції дозволяє регулювати дозу ліків та їх фармакокі-

нетичний профіль. Високий рівень біологічної дії наночастинок металів на молекулярному рівні дозволяє прогнозувати цільовий механізм та зниження ефективної терапевтичної дози протианемійного препарату при застосуванні в його складі наночастинок заліза як біологічно-активної субстанції. Це сприятиме досягненню швидкої терапевтичної ефективності протианемійного препарату, високій його терапевтичній безпечності та пролонгованому збереженню протианемійного ефекту [2].

Мета роботи. Вченими Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України під керівництвом д.х.н., професора **З. Р. Ульберг** розроблений протокол колоїдно-хімічного синтезу у водному середовищі сферичних наночастинок заліза розміром 40 нм, модифікованих аскорбіновою кислотою. Кафедрами аптечної та промислової технології ліків та фармакології Національного медичного університету імені О.О.Богомольця проведені дослідження з метою фармацевтичної розробки (ФР) вискоєфективного протианемійного препарату нового покоління на основі наночастинок заліза для профілактики і лікування залізодефіцитної анемії та анемії хронічних захворювань.

Матеріали та методи. В роботі використані аналітичні, технологічні та біологічні методи дослідження. Розмір та форму отриманих наночастинок визначали методом трансмісійної електронної мікроскопії. Цитотоксичність оцінювали за обліком кількості живих клітин після їх фарбування кристалл-фіолетом та змінами інтенсивності поглинання клітинами сульфатного фарбника нейтрального червоного.

Результати та обговорення. Основними об'єктами досліджень ФР є складові компоненти лікарського препарату (ЛП), лікарська форма, технологічний процес, пакувальні матеріали і валідація виробничого процесу. До складових компонентів ЛП належать лікарські та допоміжні речовини, кількісні показники якості (специфікації), що встановлюються експериментально. Лікарська речовина (субстанція) при виробництві ЛП розглядається як терапевтичний АФІ, вибір якого здійснюється з урахуванням стабільності, біологічної активності та наявності домішок. Нанозалізо – це загальне поняття, яке охоплює матеріали з нанометровими лінійними розмірами на основі заліза: наночастинки нуль-валентного заліза, або наночастинки Fe^0 (zero-valent iron nanoparticles), наночастинки оксиду заліза (iron oxide nanoparticles) або суперпарамагнітні наночастинки оксиду заліза (superparamagnetic iron oxide nanoparticles), композитні наноматеріали [2]. Залізо виконує в організмі функції переносника кисню та електронів, а також діє як каталізатор у життєвоважливих метаболічних процесах. Біологічна особливість заліза полягає у тому, що цей елемент може мати різні ступені окиснення, основними з яких є закис (II) та окис (III) заліза. Найбільшу біодоступність має Fe(II) . Всмоктуванню Fe(III) сприяє аскорбінова кислота та соляна кислота.

Соляна кислота шлунка іонізує залізо з утворенням FeCl_2 , а під впливом аскорбінової кислоти має місце перетворення тривалентного заліза у двовалентне, яке краще всмоктується. Всмоктування заліза здійснюється в дванад-

цятипалій кишці та проксимальному відділі тонкої кишки. При залізодефіцитних анеміях – і в дистальних відділах. В дванадцятипалій кишці залізо реагує з NaHCO_3 і перетворюється в Fe(OH)_2 , яке утворює комплекс з спеціальним білком переносником – апоферитином з утворенням комплексу під назвою ферит. Останній комплекс в слизовій оболонці виконує функцію депо залізу в кишечнику, а також сприяє передачі заліза білку трансферину з утворенням феротрансферину. Феротрансферин транспортує залізо в депо (кістковий мозок, печінка, селезінка тощо), де знаходиться у вигляді феритину і гемосидерину. З цих депо залізо переноситься для дозрівання еритроцитів, функціонування міоглобіну, цитохромів. З огляду на вищевикладене нами в якості АФІ використана субстанція сферичних наночастинок заліза модифікованих аскорбіновою кислотою, одержаних методом хімічної конденсації у водному середовищі шляхом відновлення хлориду заліза (III). Аскорбінову кислоту вводили на останньому етапі синтезу для забезпечення підвищення стабільності та біосумісності синтезованої субстанції. Концентрація синтезованої дисперсії наночастинок заліза становила 10 мг/мл за металом.

Розміри наночастинок оксиду заліза визначають їх фізичні, біологічні і фармакологічні та токсикологічні властивості: більші наночастинки краще захоплюються макрофагами ПЕС, проте менші, як правило, довше циркулюють у кровоносному руслі та можуть проникати через судинну стінку. Тому за розміром наночастинки розподіляють на три типи: 1) надмалі суперпарамагнітні наночастинки оксиду заліза з діаметром 10–50 нм; 2) малі або стандартні суперпарамагнітні наночастинки оксиду заліза з діаметром 60–150 нм; 3) пероральні (великі) частинки оксиду заліза з діаметром у кілька мікрометрів (300 нм–3,5 мкм) [5]. Згідно даних трансмісійної електронної мікроскопії (JEM-1230, «JEOL», Японія) досліджувані наночастинки мали сферичну форму та середній розмір 40 нм.

На підставі експериментальних даних ФР визначає склад ЛП, вид лікарської форми, що забезпечує оптимальний терапевтичний ефект ліків при мінімумі побічної дії, фармакологічну раціональність, а також зручність при їх зберіганні та використанні [3]. Активність всмоктування в кров заліза при внутрішньому язевому введенні залежить від комплексу заліза з іншими компонентами. Існують відомості, що комплекс гідроокису заліза і низькомолекулярного декстрану повільно всмоктується із м'язів, а парентеральне введення препаратів заліза не сприяє значному підвищенню лікування ЗДА, але може призвести до виникнення різних побічних ефектів. Тому парентеральне введення препаратів заліза призначають рідко.

В результаті вивчення проблеми шляху введення препарату вважаємо доцільним розробку ЛП твердої форми випуску у вигляді капсул для орального застосування. Капсули - тверді лікарські засоби з твердою або м'якою оболонкою різної форми і місткості. Це дозована лікарська форма, яка складається з діючих і допоміжних речовин, поміщених в оболонку, та містить одну дозу діючої речовини. На сьогодні виготовлення і застосування капсульованих препаратів набуває все більшого значення.

Так, за кордоном промислове виробництво препаратів у капсулах посідає третє місце після таблеток і розчинів для перорального застосування. Тверді желатинові капсули призначені для дозування сипких порошкоподібних, гранульованих і мікрокапсульованих речовин. Вони мають форму циліндра з напівсферичними кінцями і складаються із двох частин — корпусу (тіла) і кришечки, що мають вільно входити одна в одну, не утворюючи зазорів. Висока популярність лікарських препаратів у капсулах пояснюється рядом переваг і позитивних якостей, а саме: високою біодоступністю (проникні для травних соків, лікувальна дія вмісту виявляється через 5-10 хв. після введення); стабільністю (оболонка з желатину непроникна для летких рідин, газів, кисню повітря); можливістю регулювати фармакологічну дію препарату (вивільнення діючих речовин відбувається в певному відділі шлунково-кишкової системи — кишковорозчинні і капсули з модифікованим вивільненням); коригувальною здатністю закінчення в оболонку речовин, що мають забарвлювальний ефект, неприємний смак і запах) [4].

Також важливим етапом нашої роботи є дослідження сумісності субстанції з допоміжними речовинами в ЛП як на стадії виробництва, так і протягом терміну зберігання. Залежно від складу ЛП між субстанцією і допоміжними речовинами можуть відбуватися взаємодії, за яких можливе отримання сполук-включень, комплексів. Комплексне вивчення фізико-хімічних характеристик лікарської речовини на етапі ФР використовується при обґрунтуванні вибору методу оцінки ефективності та безпеки ЛП. Субстанція наночастинок заліза (НЧЗ) охарактеризована як біобезпечна та біосумісна згідно з критеріями, описаними в Методичних рекомендаціях «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів», затверджених Науково-експертною радою Державного експертного центру МОЗ України. LD₅₀ субстанції НЧЗ при внутрішньошлунковому шляху введення самкам мишей лінії BALB/c перевищує 5000 мг/кг. Субстанція належить до V класу токсичності за Н. С. Hodge і Л. Н. Sterner (практично нетоксичних речовин). Синтезована субстанція наночастинок заліза була охарактеризована за показниками біобезпечності в експериментах *in vitro* та *in vivo*. Цитотоксичність оцінювали за двома методами: 1) облік кількості живих клітин проводили після їх фарбування кристалл-фіолетом, визначаючи процент живих клітин відносно до контрольних необроблених по формулі: $(\text{Пдосл}/\text{Пконтр}) \cdot 100$; 2) досліджували зміни інтенсивності поглинання клітинами суправітального фарбника нейтрального червоного (NR). Облік цитотоксичності проводили, визначаючи відсоток живих клітин відносно контрольних. Відсоток клітин, які активно поглинали NR, визначали за формулою $(\text{Пдосл}/\text{Пконтр}) \cdot 100$. Критеріями цитотоксичності слугували показники IC₁₀₀ і IC₅₀ — концентрації, які викликають відповідно 100 % та 50 % зниження активності поглинання клітинами NR.

При визначенні біобезпечності синтезованої субстанції за показником цитотоксичності і генотоксичності у якості тестової культури використовували еукаріотичні клітини лінії CHO-K1 (яєчника китайського хом'ячка) з колекції Державного науково-контрольного

інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ). Під час проведення експериментів кількість живих клітин, визначена з використанням 0,4% водного розчину трипанового синього, складала не менш ніж 90%. Отримані дані засвідчили відсутність цитотоксичного впливу синтезованої субстанції НЧЗ відносно тестових еукаріотичних клітин. Дослідження генотоксичності як маркера впливу НЧЗ розміром 40 нм продемонстрували наступне. В зразках еукаріотичних клітин лінії CHO-K1, оброблених наночастинами заліза у вивченому концентраційному діапазоні, не було зафіксовано первинних ДНК-пошкоджень, порівняно із впливом N-нітрозометилсечовини, яка є відомим генотоксикантом. Отже, отримані дані вказують на те, що експериментальна субстанція НЧЗ в умовах *in vitro* виявилася біобезпечною за визначеними маркерами.

Висновки. 1. Вивчена перспективна субстанція для фармацевтичної розробки лікарських препаратів - наночастинок заліза, модифіковані аскорбіновою кислотою, в якості активного фармацевтичного інгредієнту. Розмір та форму отриманих наночастинок визначені методом трансмісійної електронної мікроскопії. Встановлено, що дана субстанція - сферичні наночастинок заліза розміром 40 нм. 2. В результаті дослідження обрана оптимальна лікарська форма у вигляді капсул для орального застосування. 3. Синтезована експериментальна субстанція наночастинок заліза охарактеризована як біобезпечна в тестах *in vitro* та *in vivo* за показниками цитотоксичності та генотоксичності. 4. В результаті роботи встановлено, що фармацевтична розробка біобезпечного та біосумісного протианемійного препарату на основі наночастинок заліза є актуальним завданням для високоефективної терапії анеміїних станів.

Перспективи подальших досліджень. Фармацевтична розробка дає наукове обґрунтування вибору кожної допоміжної речовини, дозволеної до використання у виробництві ліків. Допоміжні речовини утворюють єдину з АФІ систему, властивості якої визначаються і спрямовані на забезпечення необхідної терапевтичної ефективності ЛП, саме тому наступним етапом дослідження є розробка оптимального складу ЛП з наночастинами заліза.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що не має конфлікту інтересів, який може сприйматися таким, що може завдати шкоди неупередженості статті.

Джерела фінансування. Ця робота була проведена в рамках наукового проекту «Розроблення та створення високоефективного протианемійного препарату нового покоління на основі наночастинок заліза для профілактики і лікування залізодефіцитної анемії та анемії хронічних захворювань» цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми наноструктурних систем, наноматеріалів, нанотехнологій» за договором № 119/12-Н.

Слова подяки. Автори висловлюють подяку вченому Інституту біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України к.б.н., с.н.с. Грузіній Т.Г., к.б.н., с.н.с. Резніченко Л.С. к.б.н., с.н.с. Дибковій С.М. за плідну співпрацю в галузі фармацевтичної нанотехнології.

ЛІТЕРАТУРА

1. World Health Organization. The World Health Report 2001: Iron deficiency anaemia assessment, prevention, and control. A guide for programme managers - Geneva. : World Health Organization, 2001
2. Полова Ж.М. Актуальні питання оцінки безпеки при розробці протіанемічного засобу з нанорозмірними частинками. / Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л.Шути-ка, випуск 23, книга 4, Київ. — 2014. — С. 511-518.

3. Руководство 42-3.1:2004 Руководства по качеству. Лекарственные средства. Фармацевтическая разработка / Н. Ляпунов, В. Георгиевский, Е. Безуглая и др. — К.: Морион, 2004. — 40 с

4. Технологія ліків промислового виробництва: підруч. для студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III-IV рівнів акредитації / В.І. Чуєшов, Л.М. Хохлова, О.О. Ляпунова та ін. / за ред. проф. В.І. Чуєшова. — Х.: Вид-во НФаУ: Золоті сторінки, 2003. — 720 с.

5. Чекман І.С. Основи наномедицини/ І.С. Чекман, В.О. Маланчук, А.В. Рибачук. - К.: Логос, 2011. - 250 с.

ИЗУЧЕНИЕ СУБСТАНЦИИ НАНОРАЗМЕРНОГО ЖЕЛЕЗА С ЦЕЛЬЮ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ КАПСУЛИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

Полова Ж.Н., Саханда И.В.

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина

Резюме. Статья посвящена исследованиям по фармацевтической разработке высокоэффективного препарата нового поколения на основе наночастиц железа для профилактики и лечения железодефицитной анемии и анемии хронических заболеваний. В работе использованы аналитические, технологические и биологические методы исследования. Размер и форму полученных наночастиц определяли методом трансмиссионной электронной микроскопии. В качестве активного фармацевтического ингредиента использована субстанция наночастиц железа модифицированных аскорбиновой кислотой, полученных методом химической конденсации в водной среде путем восстановления хлорида железа (III). Размеры наночастиц оксида железа определяют их физические, биологические и фармакологические и токсикологические свойства. Установлено, что данная субстанция - сферические наночастицы железа размером 40 нм. На основании экспериментальных данных фармацевтическая разработка определяет вид лекарственной формы, обеспечивает оптимальный терапевтический эффект лекарств при минимуме побочных эффектов, а также удобство при их хранении и использовании. В результате изучения проблематики пути введения препарата избран вид лекарственной формы и путь введения - твердая форма выпуска в виде капсул для орального применения. Комплексное изучение физико-химических характеристик лекарственного вещества на этапе разработки используется при обосновании выбора метода оценки эффективности и безопасности препарата. Субстанция наночастиц железа охарактеризована по показателям биобезопасности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Фармацевтическая разработка дает научное обоснование выбора каждого вспомогательного вещества, разрешенного к использования в производстве лекарств. Вспомогательные вещества образуют единую с активным фармацевтическим ингредиентом систему, свойства которой определяются и направлены на обеспечение необходимой терапевтической эффективности препарата, поэтому следующий этап исследования будет посвящен разработке оптимального состава твердых желатиновых капсул с наночастицами железа.

Ключевые слова: наночастицы железа, железодефицитная анемия, капсулы, твердая лекарственная форма.

THE STUDY OF NANOSCALE IRON SUBSTANCE FOR THE PURPOSE OF DEVELOPING PHARMACEUTICAL CAPSULE DOSAGE FORM

Z.Polova, I.Sakhanda

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Summary. The article is devoted to research on the development of a highly efficient pharmaceutical preparation of a new generation of iron-based nanoparticles for prevention and treatment of iron deficiency anemia and anemia of chronic disease. While the modern market of drugs represented a significant arsenal of antianemic preparations, characterized by different iron content and the presence of auxiliary components that affect the pharmacokinetics of different dosage forms, but they do not fully meet the requirements of doctors and patients. We used the analytical, technological and biological research methods. The size and shape of the preparation of nanoparticles was determined by transmission electron microscopy. As the active ingredient of the pharmaceutical substance used iron ascorbic acid modified nanoparticles produced by chemical condensation in an aqueous medium by reduction of iron chloride (III). The dimensions of the iron oxide nanoparticles determines their physical, biological and pharmacological and toxicological properties. It is found that this substance - spherical iron nanoparticles of 40 nm. Based on experimental data, the pharmaceutical development determines the type of dosage form, provides an optimal therapeutic effect of drugs with minimal side effects, as well as ease of storage and use. As a result of studying the problems of the route of administration chosen type of dosage form and route of administration - the solid form of release in the form of capsules for oral administration. Complex study of physical and chemical characteristics of the drug at the design stage is used to justify the choice of method for assessing the efficacy and safety of the drug. The substance iron nanoparticles described in terms of biosafety in experiments *in vitro* and *in vivo*. Pharmaceutical development provides a scientific rationale for the selection of each of the auxiliary substances permitted for use in the manufacture of medicines. Excipients form a single active pharmaceutical ingredient in a system whose properties are determined and focused on providing the necessary therapeutic efficacy of the drug, so the next stage of research will focus on developing the optimal composition of hard gelatin capsules with the nanoparticles of iron.

Keywords: nanoparticles of iron, iron deficiency anemia, a capsule, the solid dosage form.