

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра материаловедения, технологии
и управления качеством

**ВАРЬИРОВАНИЕ РАЗМЕРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СИСТЕМ
АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ, ОСНОВЫ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента магистратуры 2 курса 209 группы
направления 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов»
профиль «Материаловедение фармацевтического и медицинского назначения»
факультета нано- и биомедицинских технологий

Стенькина Никиты Станиславовича

Научный руководитель
доцент, к.ф.-м.н., доцент

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

М.В.Ломова

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой
профессор, д.ф.-м.н.

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

С.Б. Вениг

инициалы, фамилия

Введение. На настоящий момент фармакология содержит достаточно перспективное направление развития, а именно адресная (таргетная) доставка лекарственных препаратов.

Доставка лекарства в необходимую область живого организма осуществляется с помощью определенных веществ (носителей), размеры которых находятся в пределах десятков или сотней нанометров. Носители важнейшим образом определяют основные параметры лечения заболеваний, так как они могут иметь химическую структуру и природу происхождения.

Целью выпускной квалификационной работы является изучение основ и различных способов адресной доставки лекарственных препаратов, получение частиц карбоната кальция, изучение влияния обработки растворами ЭДТА различных концентраций на величину диаметра частиц, а также получение эмульсии для дальнейшего использования в капсулах для парентерального питания.

Задачи работы:

1. Обзор научной и учебной литературы по данной теме.
2. Наглядная демонстрация способов адресной доставки лекарств.
3. Получение частиц карбоната кальция.
4. Обработка полученных частиц растворами ЭДТА различных концентраций.
5. Получение снимков карбоната кальция и измерение диаметра полученных частиц, с целью расчета среднего диаметра для каждой из выборки частиц для изучения влияния обработки растворами ЭДТА различных концентраций на этот параметр.
6. Получение эмульсии для дальнейшего использования в капсулах для парентерального питания.

Дипломная работа занимает 52 страницы, имеет 23 рисунка и 1 таблицу.

Обзор составлен по 38 информационным источникам.

Во введение рассматривается актуальность работы, устанавливается цель и выдвигаются задачи для достижения поставленной цели.

Первый раздел представляет собой описание возможных вариантов реализации капсул наноразмерного и микроразмерного масштабов и описании свойств, присущих тем или иным материалам и объектам, а также описание способа парентерального питания, и состоит из следующих подразделов: адресная доставка лекарственных препаратов, наноразмерные носители для лекарственных препаратов, полимерные наночастицы, липосомы, углеродные нанотрубки, нанодисперсные алмазы, функционализированный порфирином фуллерен, твердотельные магнитные системы, золото-серебряные наноклетки, карбонат кальция, парентеральное питание, компоненты парентерального питания, компоненты используемые в экспериментальном образце для парентерального питания.

Во втором разделе работы представлена методика получения частиц карбоната кальция, получение снимков, на основании которых рассчитывался средний диаметр данных частиц и анализ зависимости размера среднего диаметра для частиц от обработки их растворами ЭДТА разных концентраций, а также получение эмульсий на основе ЧСА, БСА и яичного фосфолипида с маслом. Он включает в себя такие подразделы, как метод приготовления CaCO_3 для анализа, измерение размера полученных частиц, получение эмульсий на основе человеческого альбумина, бычьего альбумина и яичного фосфолипида.

Научная новизна данной работы состоит в исследовании влияния растворов ЭДТА различных концентраций на диаметр получаемых частиц карбоната кальция (ватерит). А также исследование образования эмульсий различных белковых структур с маслом для дальнейшего использования в парентеральном питании.

Обработка ЭДТА влияет на радиус получаемых частиц карбоната кальция, что делает возможным контроль размерных характеристик данных частиц. Эмульсии на основе ЧСА, БСА и яичного фосфолипида с маслом возможно использовать для получения капсул и использования их в парентеральном питании.

Основное содержание работы

Адресная доставка лекарственных препаратов. Доставка лекарственных средств, при помощи определенного рода носителей, впервые была рассмотрена в конце 19 века выдающимся бактериологом Паулем Эрлихом, который ввел такой термин как «волшебная пуля». Под этим названием имеется в виду лекарство, способное находить точное место в пространстве организма для уничтожения клеток, находящихся в очаге опухоли. При этом лекарство никак не влияет на работу здоровых тканей [1].

Наноразмерные носители для лекарственных препаратов. В качестве носителей для лекарств могут выступать вещества различной природы и строения, что делает возможным получения материалов с разными свойствами, оптимальными для той или иной области организма. Ферменты, белки, рибосомы и вирусы образуют группу биологических и биогенных частиц [2].

Карбонат кальция. Для того, чтобы провести конструирование капсулы, необходимо использовать некую 'матрицу', на которую и будет наноситься материал капсул. В качестве такой матрицы можно использовать частицы карбоната кальция (CaCO_3). Биосовместимость и малая токсичность CaCO_3 наряду с его низкой себестоимостью обусловили интерес к этому материалу и в медицине [3].

Парентеральное питание. Парентеральное питание (ПП) – определяется как научно обоснованное назначение различных питательных веществ, вводящиеся в организм, минуя желудочно-кишечный тракт и процесс пищеварения. Иными словами – это внутривенное питание [4].

Полным парентеральное питание можно назвать, если все потребности организма в питательных компонентах удовлетворены парентеральным путем. Частичным его можно назвать, если удовлетворены потребности только в отдельных компонентах питания, таких как: глюкоза, витамины и т.д.

ПП имеет в своей основе следующие принципы: своевременность назначения, сбалансированность компонентов питания, оптимальность сроков проведения ПП.

Считаются показаниями к ПП случаи, когда больные: По различным причинам не хотят или не могут есть (анорексия, синдром короткой кишки, ожоги и т.д.); Не должны есть (послеоперационный период).

Компоненты парентерального питания. Вода представляет собой один из важнейших элементов парентерального питания, ее базальная суточная потребность составляет 25 мл/кг [4].

Глюкоза – является одним из наиболее распространенных ингредиентов входящих в состав парентерального питания. Энергетическая ценность ее составляет – 4,1 ккал/г [4].

Жировые эмульсии (ЖЭ) наряду с водой и углеводными компонентами является одним из основных нутриентов в парентеральном питании.

Белки являются главной составной частью организма человека. Помимо структурных функций организма они регулируют метаболические и ферментативные процессы. Также, они участвуют в иммунитете.

Витамины также являются важным компонентом ПП. Но точная дозировка витаминов для реанимационных больных неизвестна [5].

Компоненты используемые в экспериментальном образце для парентерального питания. Бычий сывороточный альбумин (БСА, BSA) – является белком плазмы крови крупного рогатого скота с молекулярной массой ~69 кДа, одноцепочечный, состоящий из 607 аминокислотных остатков. Он является весьма хорошо и широко изученным протеином крови, составляющий 70% от общего протеинового состава. Концентрация БСА в плазме 35-55 мг/мл.

Человеческий альбумин. Альбумин определяется как водорастворимые глобулярные белки. В тканях практически всех животных и растений обнаруживается альбумин. Если определять альбумин согласно медицинской терминологии, то под ним понимается один вид белков человека, который называется человеческий сывороточный альбумин (ЧСА).

Яичный фосфолипид (лецитин из яичного желтка). Фосфолипиды являются очень важными структурными элементами биологических мембран. Состав глицерофосфолипидов определяется наличием глицерина, фосфатной

группы, двух жирных кислот и полярной органической молекулы (холин, серин, инозит или этаноламин) [6].

Метод приготовления CaCO_3 для анализа.

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) – представляет собой органическое соединение. Это четырехосновная карбоновая кислота с химической формулой $(\text{HOOCCH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ [7].

ЭДТА в лабораторной практике работы с частицами карбоната кальция используется в качестве растворителя для ядра капсул (ядром является карбонат кальция), но при работе с меньшими концентрациями ЭДТА (порядка 0,1 М), он может быть использован как агент хелатирования для образования пор и уменьшения частиц карбоната кальция.

Далее приведена методика приготовления частиц карбоната кальция (ватеритной формы).

Было взято по 615 мкл CaCl_2 (1 моль) и Na_2CO_3 (1 моль) и 2 мл воды. Сначала вливаем в стакан на 50 мл 615 мкл одномолярного раствора CaCl_2 . После чего включаем магнитную мешалку и добавляем 2 мл воды.

Затем по стенке стакана медленно вливаем 615 мкл одномолярного раствора Na_2CO_3 с целью образования мелкодисперсного осадка.

По добавлению раствора Na_2CO_3 в реакционную смесь наблюдаем образование белого осадка. Получившийся осадок CaCO_3 вместе с жидкостью реакционной среды отбираем в пипетку и переносим в 2 эппендорфа на 2мл. Так как объём реакционной среды меньше 4 мл (сумма объемов двух эппендорфов) то в тот эппендорф, в котором прилитый после реакции раствор с осадком остаётся в недостатке, мы добавляем воду, доводя объём раствора до 2 мл. После этого ставим 2 эппендорфа в центрифугу, расположив их диаметрально противоположно. Наблюдаем отделение осадка от жидкости раствора.

Отбираем жидкость из двух эппендорфов при помощи пипетки, добавляем воду, после чего повторяем процесс ещё раз. Затем вместо воды мы

добавляем спирт, ставим эппендорфы на центрифугу, отбираем с помощью пипетки спирт от осадка.

Так как осадок ещё не сухой, необходимо высушить остатки спирта, поместив эппендорфы в сушильный шкаф при температуре 60 градусов на час.

Далее было приготовлено 18 образцов навесок карбоната кальция массой 10 мг для дальнейшей обработки их в растворах ЭДТА различных концентраций. Было взято по 3 образца на каждую молярность (4 различных молярностей раствора ЭДТА и вода) с целью увеличения точности анализа.

Затем необходимо приготовить набор растворов с определёнными концентрациями ЭДТА по 2 мл: 0,1 моль; 0,08 моль; 0,06 моль; 0,04 моль; 0,02 моль.

Добавляем раствор ЭДТА соответствующей концентрации в эппендорф с карбонатом кальция и ставим на термошейкер. Время реакции на термошейкере выставлено на 45 минут, так как эксперименты показали, что это оптимальное время для обработки CaCO_3 с такими концентрациями растворов ЭДТА. RPM = 900 (обороты в минуту); T=27 (температура нагревательного элемента термошейкера). Температура в лаборатории составила 24 градуса по шкале Цельсия.

По завершению реакции отбираем супернатант (осадочную жидкость) с помощью пипеточного дозатора (пипетки), промываем 1 раз водой, потом 1 раз спиртом. Ставим в сушильный шкаф осадок, на час при температуре 60 градусов по шкале Цельсия.

Измерение размера полученных частиц. Визуализация микрочастиц проводилась с использованием светового оптического микроскопа от конфокальной системы «Leica TCS SP» (Германия). С помощью программного обеспечения вывели изображение образца на компьютер.

Стандартными программными методами выставили размерную линейку для каждого исследуемого образца и сохранили полученные нами данные.

Далее, средствами программы Image J, был измерен средний диаметр для каждого из образцов CaCO_3 .

Необходимо было откалибровать шкалу измерения, делалось это путем выбора во вкладке Analyze функции Set Scale, которая задает соотношение дистанции на экране в пикселях к масштабу, указанному на снимке.

Измерение проводилось следующим образом: для каждого образца было сделано по 3 снимка в разных местах на подложке, затем для каждого снимка было измерено по 20 значений диаметров для частиц с помощью инструмента 'Линейка' в программе Image J, затем, для каждого образца значения диаметров полученных на каждом снимке записывались в таблицу 1, и считался средний диаметр для каждого из образцов.

Образцы записаны в таблицу таким образом, что сначала идет номер образца, через тире указан номер снимка образца и через точку с запятой концентрация раствора ЭДТА, которым обрабатывался образец.

Таблица 1 – Значения диаметров для образцов CaCO_3

Образцы	Средний диаметр для каждой выборки, мкм	Средний диаметр для каждой молярности ЭДТА, мкм	Минимальное значение диаметра частиц, мкм	Максимальное значение диаметра частиц, мкм	Стандартное отклонение, мкм	Значение диаметра частиц, мкм
1-1; нет	4,35	4,22	3,16	5,00	0,52	4,22±0,52
1-2; нет	4,07					
1-3; нет	4,22					
2-1; 0,02	4,15	4,12	3,54	4,93	0,4	4,12±0,4
2-2; 0,02	4,07					
2-3; 0,02	4,14					
3-1; 0,04	3,88	3,71	3,02	5,23	0,47	3,71±0,47
3-2; 0,04	3,58					
3-3; 0,04	3,67					
4-1; 0,06	3,49	3,58	3,01	4,09	0,33	3,58±0,33
4-2; 0,06	3,60					
4-3; 0,06	3,64					
5-1; 0,08	3,62	3,56	2,92	4,24	0,32	3,56±0,32
5-2; 0,08	3,57					
5-3; 0,08	3,49					
6-1; 0,1	2,69	2,99	1,99	3,07	0,35	2,99±0,35
6-2; 0,1	2,65					
6-3; 0,1	2,71					

Полученные данные о значениях средних диаметров говорят о том, что по мере увеличения концентрации раствора ЭДТА для обработки частиц, их диаметр уменьшается.

Самый малый диаметр частиц среди всей выборки диаметров был получен при обработке твердых частиц карбоната кальция одномолярным раствором ЭДТА. Самый крупный диаметр частиц наблюдается у необработанных частиц твердого карбоната кальция.

Получение эмульсий на основе человеческого альбумина, бычьего альбумина и яичного фосфолипида. Было принято использовать для изготовления эмульсий следующие компоненты:

- человеческий сывороточный альбумин (ЧСА);
- бычий сывороточный альбумин (БСА);
- яичный фосфолипид;
- подсолнечное масло.

ЧСА и БСА являются белковыми компонентами эмульсии для парентерального питания. Яичный фосфолипид и подсолнечное масло являются жировыми компонентами для получаемой эмульсии.

Сперва необходимо было приготовить растворы разных концентраций для ЧСА, БСА и яичного фосфолипида.

Было приготовлено два раствора ЧСА в воде концентрацией 4мг/мл. Для БСА было сделано то же самое. Для яичного фосфолипида приготовлено по два раствора с концентрациями 2мг/мл и 4мг/мл. Данные концентрации были взяты на основании ранее полученных рекомендаций из лаборатории.

Было приготовлено по паре растворов для каждой концентрации с целью посмотреть, как влияет время электрофореза на процесс образования эмульсий. Было выбрано время выдерживания в электрофорезе 30 секунд и 60 секунд. Далее по приготовлению данных растворов каждый из них был смешан с 500 мкл подсолнечного масла.

После чего каждый из растворов одинаковых концентраций попарно был подвергнут электрофорезу со временем выдерживания 30 и 60 секунд, для образования эмульсии с маслом.

По завершению процесса электрофореза растворы были оставлены в холодильнике на неделю, с целью исследования стабильности получаемых эмульсий. По истечению недели данные образцы были извлечены из холодильной камеры.

На рисунке 1 представлена фотография образцов по истечению срока хранения в холодильной камере (одна неделя).

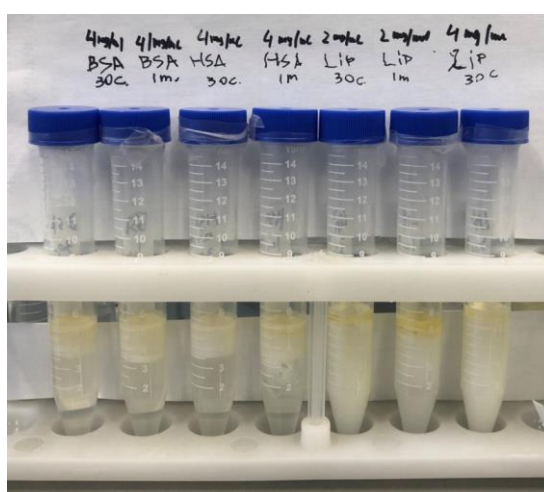


Рисунок 1 – Фотография полученных образцов эмульсий на основе ЧСА, БСА и яичного фосфолипида

Было принято решение использовать для дальнейших экспериментов эмульсию яичного фосфолипида (4 мг/мл) в масле, так как эмульсии ЧСА и БСА являются нестабильными (по истечении недели хранения в холодильной камере жидкость пробирки полностью прозрачна, что говорит о выпадении в осадок данных белков). Дальнейшая стабилизация эмульсий ЧСА и БСА с помощью таниновой кислоты и декстрансульфата не принесла никаких результатов. Для стабилизации ЧСА и БСА было взято 1:1 сначала таниновой кислоты (концентрация 3 мг/мл), после прошедшего эксперимента декстрансульфата (концентрация 3 мг/мл). Данные стабилизаторы образуют комплексные соединения с белком и обволакивают их поверхность, что служит

как бы защитным кожухом в эмульсии и по идее должно приводить к увеличению устойчивости эмульсии (сдерживание выпадения в осадок белка).

В обоих случаях ЧСА и БСА выпадал на поверхность, это означало, что данные компоненты образуют слишком устойчивые и сильные комплексы с компонентами эмульсии. Было принято решение использовать меньшую концентрацию стабилизаторов (1мг/мл), однако и этот эксперимент привел к выпадению компонента эмульсии на поверхность после вливания раствора стабилизатора в пробирку с эмульсией. Скорее всего, данные стабилизаторы не подходят для формирования защитного слоя на поверхности данных белков.

Заключение. В данной работе был получен материал матрицы, карбонат кальция, для создания на ее поверхности оболочки самих капсул. Была произведена обработка полученных частиц растворами ЭДТА различных концентраций. Получены снимки частиц на световом оптическом микроскопе.

Выяснено, что по мере увеличения концентрации раствора ЭДТА для обработки частиц, их средний диаметр уменьшается. Это связано с тем, что ЭДТА вступает во взаимодействие с полученными частицами, и, чем выше концентрация ЭДТА, тем сильнее степень 'вытравливания' частиц карбоната кальция. Этот фактор и приводит к уменьшению среднего диаметра частиц с ростом концентрации раствора ЭДТА.

Приготовлены эмульсии на основе ЧСА, БСА и яичного фосфолипида с маслом. Эмульсии ЧСА и БСА в масле показали низкую устойчивость эмульсий во времени, по истечении недели хранения в холодильной камере белки начинали выпадать в осадок, образуя криминговую фазу, жидкая фаза пробирки становилась прозрачной (эмульсия данных компонентов должна иметь мутную фазу). Выяснено, что таниновая кислота и декстрансульфат образуют слишком сильные и устойчивые комплексы с ЧСА и БСА и они непригодны для стабилизации данных эмульсий. Эмульсия яичного фосфолипида (концентрацией 4мг/мл) с маслом показала хорошую стабильность во времени (по истечении недели хранения в холодильной камере он практически не выпадал в осадок с образованием криминговой фазы).

Данную эмульсию можно использовать далее в экспериментах по получению капсул для парентерального питания.

Список использованных источников

- 1 Ивонин, А. Г. Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы / А. Г. Ивонин // Известия Коми научного центра УРО РАН. – 2012. – № 1 (9). – С. 46-55.
- 2 Коржиков, В. А. Полимерные «контейнеры» для адресной доставки лекарств на основе поли (молочной кислоты) и поли (молочной-со-гликолевой кислоты): синтез полимеров и получение частиц / В. А. Коржиков // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 4. Физика. Химия. – 2013. – № 2. – С. 114–122.
- 3 Nakamura, J. Tracking the formation of vaterite particles containing aminopropyl-functionalized silsesquioxane and their structure for bone regenerative medicine / J. Nakamura // Journal of Materials Chemistry B. – 2013. – Т. 1, № 35. – С. 4446.
- 4 Данцигер, Д. Г. Искусственное питание при оказании специализированной медицинской помощи больным (лекция) / Д. Г. Данцигер // Общая реаниматология. – 2006. – Т. 2, № 3 – С. 52-57.
- 5 Бахман, А. Л. Искусственное питание / А. Л. Бахман ; под ред.: А. Л. Костюченко. – М. : БИНОМ-Невский диалект, 2001. – 190 с.
- 6 Кубекина, М. В. Фосфолипиды пищи: влияние на липидный обмен и факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний / М. В. Кубекина // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86, № 3. – С. 6-18.
- 7 Дедюхина, Э. Г. Биодegradация ЭДТА / Э. Г. Дедюхина, Т. И. Чистякова, И. Г. Минкевич // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени ЮА Овчинникова. – 2007. – Т. 3, № 2. – С. 40-49.