

УДК

*М.Ю. Хотимченко¹, О.А. Шокур², Н.Е. Ламаи³*¹ Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),² Дальневосточный государственный медицинский университет (680000 г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35),³ Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КАРРАГИНАНА ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Ключевые слова: каррагинан, сорбция, дакарбазин, циклофосфамид.

Проведена оценка связывающей способности ι-каррагинана в отношении противоопухолевых лекарственных препаратов – циклофосфамида и дакарбазина. Установлено, что каррагинан селективно связывает и удерживает молекулы дакарбазина в структуре полисахаридного геля за счет реализации процессов хемосорбции, что может служить основой для создания новых комплексных препаратов адресной доставки лекарственных веществ с контролируемым высвобождением активного соединения.

Каррагинаны – некрахмальные полисахариды, которые содержатся в клеточной стенке морских красных водорослей и представляют собой сульфатированные галактаны, содержащие D-галактозу и ее производные, остатки которых соединены регулярно чередующимися β(1→4)- и α(1→3)-связями [2]. Каррагинаны различаются содержанием 3,6-ангидрогалактозы, местоположением и количеством сульфатных групп, в соответствии с чем их разделяют на 6 главных типов: κ, λ, ι, ν, μ и θ [11]. В зависимости от типа конформация молекул каррагинана в растворе может быть различной. Так, λ-каррагинаны, характеризующиеся высоким содержанием сульфатных групп, имеют в водных растворах палочкообразную конформацию [1]. В тех же условиях κ- и ι-каррагинаны представлены в двух конформациях – спираль и гель. Способность каррагинанов образовывать в водных растворах гели является одним из наиболее важных физико-химических свойств этих полисахаридов, благодаря которому они находят применение в медицине и фармации.

Установлено, что каррагинаны проявляют антикоагулянтную активность, обладают гипополипидемическими, противоопухолевыми и иммуностимулирующими свойствами [3, 6, 12, 13]. Предполагается, что большинство их фармакологических эффектов обусловлено способностью связываться с различными биологическими соединениями, изменяя тем самым течение биохимических реакций. В настоящее время существуют данные о том, что благодаря способности связываться с различными субстанциями каррагинаны могут найти применение в качестве безопасных и эффективных средств, обеспечивающих адресную доставку лекарственных веществ в организме [5]. Считается, что использование адресной доставки лекарственных веществ в некоторых областях медицины, таких как онкология или ревматология, может значительно по-

высить эффективность фармакотерапии и снизить частоту нежелательных реакций [4, 10]. Основным свойством соединений, применяемых в качестве молекул-переносчиков, является их способность связывать и удерживать лекарственное вещество в своей структуре. Существуют данные, указывающие на возможность применения некоторых типов каррагинанов в качестве средств доставки биологически активных соединений, в том числе и лекарственных препаратов [5, 7]. В связи с этим целью настоящей работы стала оценка связывающей способности ι-каррагинана при взаимодействии с противоопухолевыми лекарственными веществами – циклофосфамидом и дакарбазином. Изучена кинетика связывания с последующим расчетом основных параметров сорбционных процессов.

Материал и методы. Использованы препарат ι-каррагинана из красных водорослей коммерческой чистоты, приобретенный в Sigma-Aldrich (США) и противоопухолевые лекарственные препараты циклофосфамид («Биохимик», Россия) и дакарбазин (Lachema, Чешская республика).

Для определения связывающей способности каррагинана в пластиковую емкость (20 мл), снабженную магнитной мешалкой и комбинированным стеклянным электродом для постоянного измерения водородного показателя, вносили 10 мл 0,2% раствора каррагинана, 1 мл 1М ацетатного буфера (рН 4) и необходимый объем 0,2% раствора дакарбазина. Затем объем пробы доводили до 20 мл бидистиллированной водой. Кислотность среды корректировали добавлением 0,1М раствора NaOH или HNO₃. После этого смесь инкубировали при постоянном перемешивании в течение заданного промежутка времени. Затем жидкую фазу, содержащую свободный лекарственный препарат, отделяли в ультрафильтрационной ячейке через мембрану с пропускной способностью 10 кД. Предварительно опытным путем было установлено, что данный фильтр задерживает молекулы используемого образца каррагинана, но пропускает циклофосфамид и дакарбазин. Концентрацию циклофосфамида и дакарбазина в пробе определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флюоресценцией.

Количество препарата, связанного каррагинаном, вычисляли по формуле:

$$q = V(C_0 - C_e) / M,$$

где q – количество связанного каррагинаном препарата, мг/г; V – объем раствора в инкубационной

Хотимченко Максим Юрьевич – канд. мед. наук, доцент кафедры общей и клинической фармакологии с курсом ФПК и ППС ВГМУ; тел.: 8 (4232) 74-70-10, e-mail: maxkhot@yandex.ru.

емкости, л; C_0 – начальная концентрация препарата в растворе, мг/л; C_e – конечная концентрация препарата в растворе, мг/л; M – масса каррагинана, внесенного в инкубационную смесь, г.

Для изучения кинетики связывания противоопухолевых препаратов в стеклянные колбы емкостью 20 мл вносили 5 мл свежеприготовленного 0,2% раствора циклофосфида или дакарбазина, 1 мл 1М ацетатного буфера (рН 4) и 10 мл 0,2 % раствора каррагинана. Затем объем пробы доводили до 20 мл бидистиллированной водой. Смесь инкубировали в течение заданных промежутков времени, после чего гель каррагинана отделяли по методике, описанной выше. В надосадочной жидкости определяли концентрацию лекарственного препарата. Результаты выражали в виде среднего значения трех повторных экспериментов.

Данные о связывающей способности вещества при различных равновесных концентрациях используются для расчета констант сорбции при помощи математических моделей сорбционных процессов [8]. В настоящей работе были применены модель Лэнгмюра, характеризующая связывание сорбата в виде монослоя сорбентом с ограниченным количеством гомогенных активных центров, модель Фрейндлиха, описывающая связывание сорбата в виде монослоя сорбентом с ограниченным количеством гетерогенных активных центров, и модель Брюне–Эмметт–Таллера, которая характеризует связывание веществ в виде полислоя.

Расчет параметров модели Лэнгмюра проводили по формуле:

$$q = \frac{q_{max} \times C_e}{K + C_e},$$

где, q – количество связанного препарата, мг/г; q_{max} – коэффициент максимальной сорбционной емкости, определяющий количество активных центров связывания в молекуле сорбента, мг/г; C_e – равновесная концентрация, мг/л; K – коэффициент аффинитета, определяющий величину сродства сорбента к сорбату, л/мг.

Расчет параметров модели Фрейндлиха проводили по формуле:

$$\log q = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e,$$

где q – количество связанного препарата; K_F и n – константы Фрейндлиха, отражающие интенсивность связывания и прочность образующихся связей, соответственно; C_e – равновесная концентрация, мг/мл.

Расчет параметров модели Брюне–Эмметт–Таллера проводили по формуле:

$$\frac{C_e}{(C_0 - C_e)} = \left(\frac{1}{BQ} \right) + \left(\frac{B-1}{BQ} \right) \left(\frac{C_0}{C_e} \right),$$

где C_e – равновесная концентрация, мг/л; C_0 – начальная концентрация сорбата в растворе, мг/л; B – константа, отражающая энергию поверхностного взаимодействия компонентов системы; Q – коэффициент максимальной сорбционной емкости, определяющий количество активных центров связывания в молекуле сорбента, мг/г.

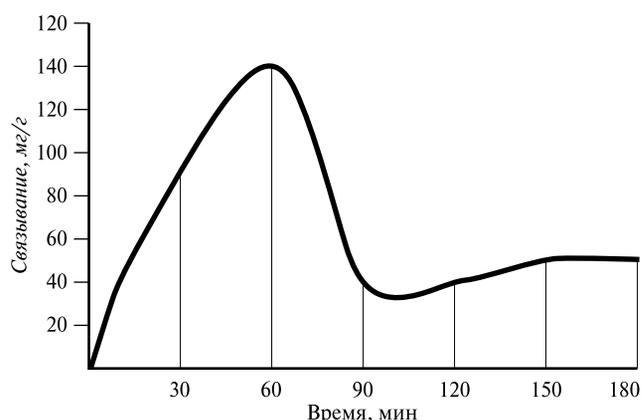


Рис. 1. Кинетика связывания дакарбазина ι-каррагинаном.

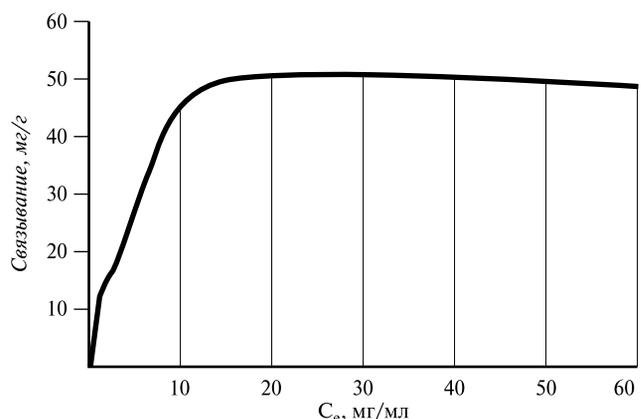


Рис. 2. Сорбционная емкость ι-каррагинана в отношении дакарбазина при различных концентрациях лекарственного препарата в растворе.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Образец ι-каррагинана проявлял связывающую активность в отношении дакарбазина и не вступал во взаимодействие с циклофосфамидом.

Изучение скорости связывания ι-каррагинаном дакарбазина показало, что процесс взаимодействия этих веществ протекал в две фазы (рис. 1). В 1-ю фазу, длительность которой составляла около 60 мин, происходило активное взаимодействие лекарственного препарата и сорбента, которое достигало максимальных значений к концу фазы. В дальнейшем, в течение 2-й фазы, происходило сжатие каррагинанового геля (сенерезис), в результате чего из полисахаридного матрикса высвобождался ранее связанный препарат. Следует отметить, что интенсивность связывания дакарбазина была сопоставима со скоростью его последующего высвобождения. В дальнейшем количество дакарбазина, находившегося в связанном состоянии, составляло около 35–40% от значений, зарегистрированных через 60 мин инкубации.

Изучение зависимости связывания дакарбазина каррагинаном при различных концентрациях лекарственного препарата в сорбционной системе показало, что при увеличении остаточной концентрации сорбата его количество, связанное сорбентом на единицу массы, возрастало (рис. 2). Это происходило потому, что связывание вещества любым сорбентом пред-

Таблица 1
 Параметры связывания дакарбазина и циклофосфамида
 L-каррагинаном

Параметры сорбции	Дакарбазин	Циклофосфамид
Модель Лэнгмюра		
q_{\max} , мг/г	52,63	0
K, мл/г	0,542	0
R ²	0,996	—
Модель Фрейндлиха		
K _F , мг/г	3,483	0
n	3,03	0
R ²	0,885	—
Модель Брюне–Эмметт–Таллера		
Q, мг/г	15,84	0
B	12,51	0
R ²	0,300	—

Таблица 2
 Значения частотного коэффициента (R_L) при связывании
 дакарбазина L-каррагинаном

C ₀ , мг/л	R _L
20	0,084
40	0,044
60	0,029
80	0,022
100	0,018

ставляет собой реакцию образования координационных связей между молекулами двух соединений, которая постепенно прекращается при достижении так называемой равновесной концентрации. В подобных условиях количество молекул сорбата, находящихся в связанном и свободном виде, постоянно. При дальнейшей инкубации сорбционной системы происходит одновременное уравнивание процессов поглощения и высвобождения вещества из сорбционного матрикса. В случае изменения концентрации одного из компонентов сорбционной системы равновесная концентрация также изменяется [9].

Анализ полученных данных указывал на наличие сорбционных реакций между каррагинаном и дакарбазином, протекавших по типу модели Лэнгмюра, о чем свидетельствовало высокое значение коэффициента аппроксимации (табл. 1). Исходя из графика линейаризации уравнения Лэнгмюра можно предположить, что в процессе взаимодействия каррагинана и дакарбазина происходило образование одинаковых связывающих центров в молекулах каррагинана, которые способны захватывать и удерживать одну молекулу лекарственного препарата (рис. 3). Количество связывающих центров соответствовало 52,63 мг дакарбазина, связанного 1 г каррагинана. Положительное значение коэффициента b указывало на наличие

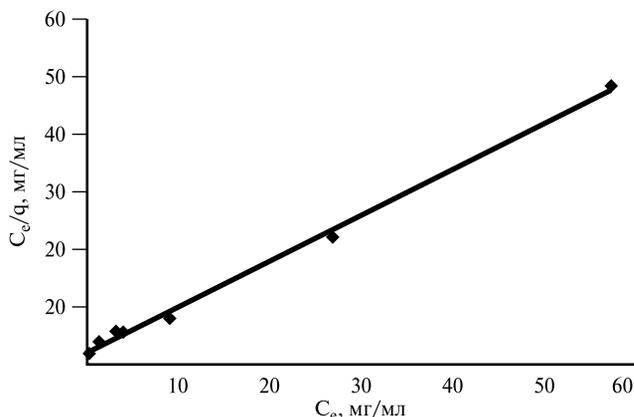


Рис. 3. Линейаризация модели сорбции Лэнгмюра, иллюстрирующая связывания дакарбазина L-каррагинаном.

определенной степени аффинитета молекул каррагинана к молекулам дакарбазина. Для подтверждения достоверности значения аффинитета был произведен расчет частотного коэффициента R_L, который отражает вероятность преобладания сорбционных процессов над десорбцией. В случае, если значения частотного коэффициента больше 0, но меньше 1, реакция протекает в направлении сорбции (табл. 2). При различных значениях концентрации дакарбазина в сорбционной системе в данных условиях каррагинан может рассматриваться как эффективный сорбент дакарбазина. Коэффициент аппроксимации R₂ для уравнения Фрейндлиха оказался значительно ниже 0,95, что указывало на отсутствие гетерогенности образованных связывающих центров в молекулах каррагинана. При этом расчет констант Френдлиха указывал на наличие химических связей между молекулами обоих исследованных веществ, обладающих определенной степенью прочности. На основании полученных данных, можно предположить, что механизмом связывания дакарбазина каррагинаном является хемосорбция. Коэффициент аппроксимации R₂ для модели Брюне–Эмметт–Таллера в свою очередь указывал на невозможность применения данного уравнения и на недостоверность значений рассчитываемых констант.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о наличии химического взаимодействия между молекулами среднесульфатированного L-каррагинана и противоопухолевого лекарственного препарата дакарбазин. Благодаря значимому аффинитету в отношении дакарбазина каррагинан может быть использован в фармацевтической технологии в качестве основы для разработки систем адресной доставки лекарственных веществ в терапии онкологических заболеваний. Двухфазность кинетики взаимодействия дакарбазина и каррагинана, характеризующаяся сменой процессов сорбции и высвобождения лекарственного вещества из каррагинанового матрикса, позволяет разработать препараты, которые будут обеспечивать высвобождение фармакологически активного соединения в определенное время после

введения или в определенных условиях среды, что в итоге повысит эффективность терапии и снизит риск побочных эффектов.

Литература

1. Brant D., Buliga G. *Chemical Structure and macromolecular conformation of polysaccharides in the aqueous environment // Biotechnology of marine polysaccharides / ed. Colwell E. Washington—New York—London, 1985. P. 29–73.*
2. Chapman V.J., Chapman D.J. *Seaweeds and their uses. London—New York: Chapman and Hall, 1980. 334 p.*
3. Cicala C., Morello S., Alfieri A. et al. *Haemostatic imbalance following carrageenan-induced rat paw oedema // Eur. J. Pharmacol. 2007. Vol. 577. P. 156–161.*
4. Coimbra M., Kuijpers S.A., van Seters S.P. et al. *Targeted delivery of anti-inflammatory agents to tumors // Curr. Pharm. Des. 2009. Vol. 15. P. 1825–1843.*
5. Mohamadnia Z., Zohuriaan-Mehr M.J., Kabiri K. et al. *pH-Sensitive IPN Hydrogel Beads of Carrageenan-Alginate for Controlled Drug Delivery // J. Bioact. Compatible Polymers. 2007. Vol. 22. P. 342–356.*
6. Panlasigui L.N., Baello O.Q., Dimatungal J.M., Dumelod B.D. *Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers // Asia Pac. J. Clin. Nutr. 2003. Vol. 12. P. 209–214.*
7. Santo V.E., Frias A.M., Carida M., et al. *Carrageenan-Based Hydrogels for the Controlled Delivery of PDGF-BB in Bone Tissue Engineering Applications // Biomacromolecules. 2009. Vol. 10. P. 1392–1401*
8. Volesky B. *Sorption and biosorption. Quebec: BV-Sorbex Inc., St. Lambert, 2004. 316 p.*
9. Volesky B. Naja G. *Biosorption technology: Starting up an enterprise // Int. J. Technology Transfer & Commercialization. 2007. Vol. 6. P. 196–211.*
10. Wagner A.D., Moehler M. *Development of targeted therapies in advanced gastric cancer: promising exploratory steps in a new era // Curr. Opin. Oncol. 2009. Vol. 21. P. 381–385.*
11. Yermak I.M., Khotimchenko Y.S. *Chemical properties, biological activities and applications of carrageenans from red algae // Recent Advan. Mar. Biotechnol. 2003. Vol. 9. P. 207–255.*
12. Yoshikawa Y., Hirayasu H., Tsuzuki S., Fushiki T. *Carrageenan inhibits granzyme A-induced detachment of and interleukin-8 release from alveolar epithelial A549 cells // Cytotechnology. 2008. Vol. 58. P. 63–67.*
13. Zhou G., Sheng W., Yao W., Wang C. *Effect of low molecular lambda-carrageenan from Chondrus ocellatus on antitumor H-22 activity of 5-Fu // Pharmacol. Res. 2006. Vol. 53. P. 129–134.*

Поступила в редакцию 22.01.2010.

ESTIMATING PROBABLE APPLICATION OF CARRAGEENANS FOR RECIPIENT-ORIENTED DELIVERY OF ANTI-CANCER DRUGS

M.Yu. Khotimchenko¹, O.A. Shokur², N.E. Lamash³

¹Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av., Vladivostok, 690950, Russia), ²Far-Eastern State Medical University (35 Muravieva-Amurskogo St. Khabarovsk 680000 Russia), ³Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmundsky, FEB RAS (17 Palchevskogo Street, Vladivostok, 690041, Russia)

Summary – The authors estimate binding ability of λ -carrageenan with respect to anti-tumor drugs — cyclophosphamide and dacarbazine. The carrageenan selectively bind and retain molecules of dacarbazine in the polysaccharidic gel medium structure due to chemical adsorption processes that can be used to create new all-inclusive drugs for recipient-oriented delivery of drug substances with controlled release of an active compound.

Key words: carrageenans, sorption, dacarbazine, cyclophosphamide.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 2, p. 59–62.

УДК 577.114.083-547.458.88

В.В. Ковалев¹, Е.А. Коленченко¹, К.Е. Макарова²

¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17),

² Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА ВЫСОКОЭТЕРИФИЦИРОВАННОГО И НИЗКОЭТЕРИФИЦИРОВАННОГО ПЕКТИНОВ

Ключевые слова: пектин, кислотный гидролиз, ангидрогалактурановая кислота.

Исследован процесс кислотного гидролиза высоко- и низкоэтерифицированного пектинов в 0,5М HCl при 90°C. Кислотный гидролиз высокоэтерифицированного пектина сопровождался снижением степени этерификации с образованием низкоэтерифицированного пектина. При гидролизе низкоэтерифицированного пектина скорость процесса в первые 1,5 часа быстро уменьшалась, затем оставалась практически постоянной. При этом на первом этапе образовывались продукты, обогащенные нейтральными сахарами, а на втором — полигалактурановой кислотой. Молекулярная масса, при которой возможен фазовый переход продуктов гидролиза из геля в раствор, составляла около 10 кДа. Установлена зависимость фракционного состава продуктов от времени гидролиза.

Пектины относятся к гликаногалактуронам, кислым растительным полисахаридам, главную углевод-

ную цепь которых составляют 1,4-связанные остатки α -D-галактурановой кислоты. Пектины содержатся во всех высших цветковых растениях, где они входят в состав клеточных стенок и срединных пластинок [2].

Низкомолекулярные пектины являются перспективными соединениями для разработки новых лекарственных средств благодаря их способности оказывать резорбтивное действие, обусловленное их абсорбцией в кишечнике. Ранее было показано, что низкомолекулярные пектиновые соединения ускоряют выведение тяжелых металлов с мочой [8]. Помимо этого, благодаря низкой степени полимеризации, модифицированные пектины проявляют противоопухолевую активность в отношении рака толстого кишечника, рака молочной железы, мелкоклеточной миеломы и гемангиосаркомы [5, 9, 10, 12, 13, 15]. Обнаруженная эффективность обусловлена наличием в молекуле пектина большого количества β -галактозы,

Коленченко Елена Алексеевна — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии ИБМ ДВО РАН; тел.: 8 (4232) 55-52-09; e-mail: eakolenchenko@mail.ru.