

---

---

МРНТИ 31.25.15

*Т.С. Жұмағалиева<sup>1</sup>, М.Ж. Бүркеев<sup>1</sup>, Е.М. Тажбаев<sup>1</sup>,  
А.Т. Қажмұратова<sup>1</sup>, Д.А. Муханова<sup>1</sup>, Ж.Т. Арыстанова<sup>1</sup>*

*“Е.А. Бөкетов атындағы Қарағанды мемлекеттік университеті”  
Қарағанды Қазақстан*

## **МЕТОТРЕКСАТ ПРЕПАРАТЫН АЛЬБУМИН МАТРИЦАСЫНА ИММОБИЛДЕУ**

---

---

**Түйіндеме.** Биоүйлесімді табиғи полимер альбуминнің қатерлі ісікке қарсы метотрексат препаратымен иммобилденген нанобөлшектері десольвация әдісімен синтезделінді. Нанобөлшектердің түзілуіне температураның, дәрілік заттың концентрациясының әсері зерттелді. Түзілген нанобөлшектердің физика-химиялық сипаттамалары, яғни өлшемі, полидисперстілігі фотонды корреляциялы спектроскопия әдісімен анықталды және орташа өлшемді дәрілік заттың концентрациясынан тәуелді 165-295 нм құрады. Енгізу әдісімен иммобилденген нанобөлшектердің құрамында дәрілік заттың мөлшері оның концентрациясын арттырған сайын жоғарылайтыны байқалды және метотрексаттың полимермен байланысу дәрежесі 35-67 % болды. Альбумин матрицасынан биологиялық белсенді заттың босап шығу кинетикасы биологиялық модельдеуші жағдайларында УК-спектрофотометрлік әдіспен анықталды және әр түрлі концентрациялы дәрілік заттың нанобөлшектен босап шығу дәрежесі 84-97 % болды. Дәрілік затпен иммобилденген нанобөлшектердің морфологиясы трансмиссионды электронды микроскопта зерттелді және сфералық формада екені анықталды.

**Түйінді сөздер:** нанобөлшек, полидисперстілік, иммобилдеу, альбумин, метотрексат.

\* \* \*

**Аннотация.** Наночастицы биосовместимого природного полимера альбумина, иммобилизованные противоопухолевым препаратом метотрексат, синтезированы путем десольвации. Изучено влияние температуры и концентрации лекарственного вещества на образование наночастиц. Физико-химические характеристики полученных наночастиц, а именно размер частиц, полидисперсность определяли методом фотонной корреляционной

спектроскопии. Средний размер частиц в зависимости от концентрации лекарственного вещества составляет 165-295 нм. Установлено, что с увеличением концентрации лекарственного вещества в наночастице, полученного методом включения, увеличивается его содержание, а степень связывания метотрексата с полимером составляет 35-67 %. Кинетика высвобождения биологически активного вещества из матрицы альбумина определена УФ-спектрофотометрически в условиях биологической моделирующей среды степень высвобождения лекарственного вещества разной концентрации из наночастиц составляет 84-97 %. Морфология наночастиц, иммобилизованных лекарственным веществом, исследована трансмиссионным электронным микроскопом. Определена сферическая форма наночастиц.

**Ключевые слова:** наночастицы, полидисперсность, иммобилизация, сывороточный альбумин, метотрексат.

\* \* \*

**Abstract.** The nanoparticles of biocompatible natural polymer albumin, immobilized by anticancer drug methotrexate, were synthesized by desolvation. It is studied the influence of temperature and concentration of drug on the formation of nanoparticles. Physicochemical characteristics of obtained nanoparticles, such as particle size, polydispersity were determined by photon correlation spectroscopy. The average particle size on the concentration of drug is 165-295 nm. It is found that with increasing concentration of the drug in the nanoparticle obtained by inclusion content increases its degree of binding of methotrexate and the polymer is 35-67 %. The kinetics of release of active substance from the matrix of albumin is determined UF-spectrophotometrically in the conditions of biological modeling environment and degree of drug release of various concentration from the nanoparticles amounts to 84-97 %. The morphology of nanoparticles, immobilized by drug is studied by transmission electron microscope and their spherical shape is defined.

**Key words:** nanoparticles, polydispersity, immobilization, serum albumin, methotrexate.

**Кіріспе.** Табиғи құрылысы бойынша полимер – ол табиғи нанообъект және бұл дәріні тасымалдаушы ретінде дұрыс қолдана білу маңызды, себебі соның арқасында дәрілік форма бізге қажетті, жаңа қасиеттерге ие бола бастайды. Яғни, организм үшін дәрілік заттың қол жетімділігін жақсартады, биологиялық белсенді заттың пролонгирленген әсерін және тұрақты беріліп отыруын қамтамасыз етеді, дәрінің біртіндеп босап шығуын бақылайды,

ол мөлшерден аса пайдалануды болдырмайды және емдеу курсы кезінде қолданылатын дәрілік заттың дозасын азайтуға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, биологиялық белсенді заттың полимер-тасымалдаушылары уыттылықты төмендетуге, ерігіштікті өзгертуге, фармакокинетика мен фармакодинамикаға әсер етуге, жағымсыз дәм мен иісті жоюға, және де ең маңыздысы дәрілік заттың керекті мүшеге бағытталған тасымалына жетуге мүмкіндік береді [1-4].

Ісікке қарсы препараттармен жұмыс істеуші ғалымдар көп, мәселен профессор Гельперина С.Э., профессор Кройтердің ғылыми тобымен бірлесіп, айтарлықтай ұзақ уақыт бойы полиалкилцианоакрилатты нанобөлшектерді ісікке қарсы препараттарды бақылап, босату үшін зерттейді және синтезімен айналысқан және оң нәтижелер алған [5-7]. Кейінгі онжылдықтың ішінде жеткен жетістіктердің арқасында ісіктердің дәрілік терапиясы қазіргі заманғы медицинаның өзекті бөлімі бола бастады. Бұл кезде фармацевтика ғылымының дамуында биологиялық белсенді заттар, соның ішінде ісікке қарсы қосылыстар әсерінің талғамдылығын жетілдіру негізгі бағыт болып табылады. "Дәрі - организм - ісік" жүйесіндегі әрекеттесулердің күрделі механизмін ескере отырып, барлық қатерлі жаңа түзілістерде дәрілік эффект беретін жан-жақты заттың болуы мүмкін емес екендігі анық. Сондықтан, химиялық, биологиялық, фармацевтикалық және клиникалық зерттеулерге негізделетін өзіндік қасиеті бар дәрілік заттарды іздеу жалғасып келеді.

**Зерттеу мақсаты.** Бұл жұмыста метотрексаттың тиімділігін арттыру және терапевтік мөлшерін азайту мақсатында табиғи полимер - альбуминнің негізіндегі жаңа нанокұрылымды жүйе құру бағытында зерттеулер жүргізілді.

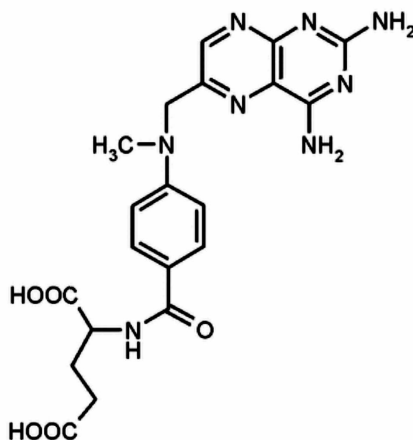
**Зерттеу әдістері.** Күкіртті альбумин матрицасына метотрексатты иммобилдеу енгізу әдісімен [8], яғни биологиялық белсенді затты реакциялық ортаға альбуминді тігу процесінде тікелей енгізумен әртүрлі температурада және дәрінің әртүрлі концентрациясында жүргізілді. Альбуминнің 2 % ерітіндісіне дәрілік заттың есептелген мөлшері қосылды, ерітіндінің ортасы рН=8,5, десольваттаушы агент ретінде этил спирті, тігуші агент ретінде

глутарь альдегиді қолданылды және 2 сағат шамасында араластырылды. Түзілген нанобөлшектер центрифугада (Centrifuge miniSpinplus 14500, Eppendorf, Германия) 14500 айн/мин жылдамдықпен тұндырылып, бөлініп алынды және бидистилденген сумен бірнеше қайтара шайылып, тұрақты массаға дейін кептірілді. Нанобөлшектердің өлшемі мен полидисперстілігі фотонды корреляциялық әдіспен ZetaNANO S90 (Malvern Instruments) қондырғысында өлшенді.

Дәрілік заттың полимермен байланысу дәрежесі және полимер матрицасынан босап шығу кинетикасы биологиялық модельдеуші жағдайларында (рН 7,4, температура 37 °С) УК-спектрофотометрлік әдіспен УФ-СПЕКТРОМЕТР СПЕКОЛ 1300 (Analytik Jena, Германия) құрылғысында ( $\lambda=375$ ) анықталды.

Нанобөлшектердің морфологиясы MIRA 3 TESCAN растрлы электронды микроскопында түсірілді.

Нәтижелерді талқылау. Метотрексат жасыл немесе сары-жасыл түске ие кристалл түріндегі ұнтақ. Суда және спиртке ерімейді. Бірақ суда еритін екпеде қолданылатын натрий тұзы түріндегі құрғақ сары, қара-сары түстегі түрі де бар. Бұл дәрілік зат жарыққа тұрақсыз. Формуласы бойынша бұл зат фолеин қышқылына жақын болып келеді (Сур. 1).



Сур. 1. Метотрексаттың құрылымдық формуласы

*Метотрексат* – метаболиттер, фолиеин қышқылдың антагонистер тобына жататын цитостатикалық дәрілік зат. Осыған байланысты метотрексат басқа цитостатиктер ішінде жиі қолданылатын препарат. Бұл препарат цитоулы болғандықтан пайдалану кезінде ағзаға тигізетін кері жақтары өте көп. Осы кемшіліктерді жою мақсатында метотрексат препаратын альбуминнің нанобөлшектеріне иммобилизациялау десольвация әдісімен жүргізілді.

Нанобөлшектердің түзілуіне әсер ететін факторлардың бірі температура. Сондықтан, біз дәрілік зат енгізілген альбумин нанобөлшектерінің физика-химиялық параметрлеріне температураның әсерін зерттедік. Дәрілік затпен (0,001 г/мл) иммобилденген нанобөлшектер синтезі 20° С - 40° С температураларда жүргізілді. Нанобөлшектер әрекеттеспеген күкіртті альбуминнан және дәрілік заттан центрифугалау арқылы бөлініп алынды. Температураның түзілген нанобөлшектердің физика-химиялық сипаттамаларына әсерін зерттеу нәтижелері 1- кестеде көрсетілген.

1 кесте

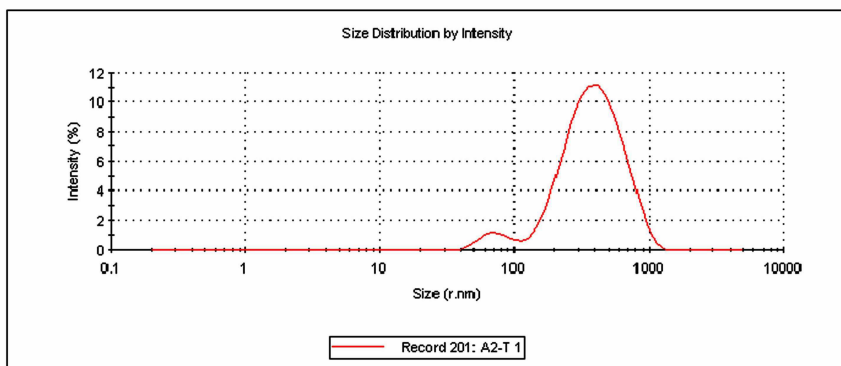
**Дәрілік затпен иммобилденген альбумин нанобөлшектерінің температурадан тәуелді физика-химиялық сипаттамалары**

| Температура, °С | Нанобөлшектердің сипаттамалары   |                   |  |
|-----------------|----------------------------------|-------------------|--|
|                 | бөлшектердің орташа диаметрі, нм | полидисперстілігі | өлшемі 1000 нм дейінгі бөлшектердің үлесі, % |
| 20              | 380,0                            | 0,493             | 59,1   |
| 25              | 295,0                            | 0,277             | 94,4   |
| 30              | 742,0                            | 0,394             | 100,0  |
| 35              | 1068,0                           | 0,436             | 100,0  |
| 40              | 1392,0                           | 0,341             | 100,0  |

1 кестеден көрініп тұрғандай, температураны жоғарылатқан сайын бөлшектердің өлшемінің артатынын байқаймыз, бұл альбумин макромолекуласының жиырылуымен байланысты. Оптималды физика-химиялық сипаттамалары бар бөлшектер 25 °С температурада түзілді, олардың үлесі 100 %. Осыған байланысты, алдағы зерттеулерде күкіртті альбуминнің дәрілік нанобөлшектерінің синтезі осы температурада жүргізіледі.

Нанобөлшектердің түзілуіне әсер ететін факторлардың тағы бірі – дәрілік заттың концентрациясының әсерін бақылау мақсатында, әртүрлі концентрацияда дәрілік зат (0,001, 0,002, 0,003 г/мл) полимерлі матрицаға енгізу арқылы 25 °С температурада иммобилизацияланды. Түзілген нанобөлшектердің өлшемі, полидисперстілігі фотонды корреляциялы спектроскопия әдісімен анықталды. Нәтижесінде 0,001 г/мл концентрациялы жүйеде өлшемі 295,0 нм және полидисперстілігі 0,277 болатын бөлшектер алынды, ал 5,6 % микробөлшек құрады (сур. 2).

|                                | <b>Size (r.nm):</b>  | <b>% Intensity</b> | <b>Width (r.nm):</b> |
|--------------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| <b>Z-Average (r.nm):</b> 295,0 | <b>Peak 1:</b> 424,3 | 94,4               | 195,7                |
| <b>Pdi:</b> 0,277              | <b>Peak 2:</b> 74,95 | 5,6                | 17,99                |
| <b>Intercept:</b> 0,917        | <b>Peak 3:</b> 0,000 | 0,0                | 0,000                |
| <b>Result quality:</b> Good    |                      |                    |                      |



Сур. 2. Дәрілік затпен иммобилденген бөлшектердің өлшемі бойынша таралуы

Сол сияқты 0,002 г/мл және 0,0003 г/мл концентрациялы дәрілік заттың полимерлі нанобөлшектерінің өлшемі анықталды. 0,002 г/мл концентрациясының жүйедегі өлшемі 165,5 нм және полидисперстілігі 0,122-ні құрады. Ал 0,003 г/мл концентрациясының жүйедегі өлшемі 170,6 нм және полидисперстілігі 0,141 құрады. Алынған дәрілік заттың барлық концентрацияларында мономодальді жүйелер түзілді. Алынған нәтижелерді 2 кестеден көруге болады.

2 кесте

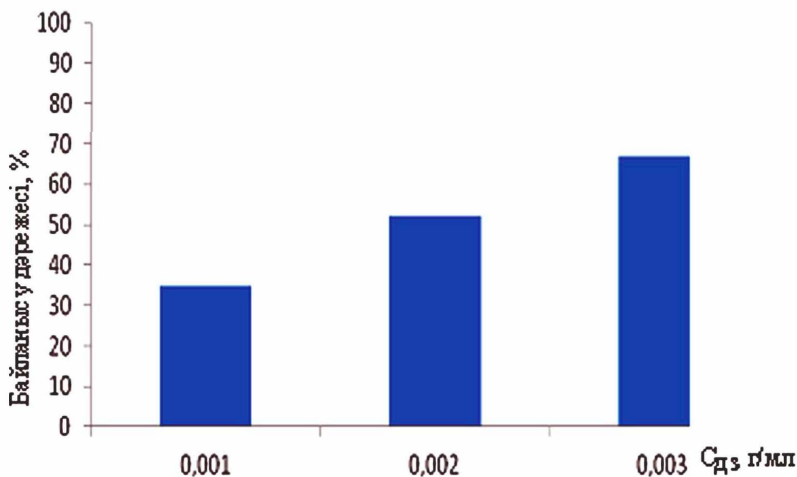
**Метотрексат концентрациясының нанобөлшектердің параметрлеріне әсері**

| Дәрілік заттың концентрациясы, г/мл | Нанобөлшектердің сипатталары     |                  |  |
|-------------------------------------|----------------------------------|------------------|--|
|                                     | бөлшектердің орташа диаметрі, нм | полидисперстілік | өлшемі 1000 нм дейінгі бөлшектердің үлесі, % |
| 0,001                               | 295,0                            | 0,277            | 94,4   |
| 0,002                               | 165,6                            | 0,122            | 100  |
| 0,003                               | 170,6                            | 0,141            | 100  |

Кестеден дәрілік заттың концентрациясы артқан сайын бөлшектердің диаметрі кішірейетінін байқаймыз. Бұл ерітіндідегі компоненттердің, яғни дәрілік зат пен полимердің әрекеттесуінен болуы мүмкін. Метотрексат полимерлі нанобөлшектерге адсорбиленіп, тұрақтандырушы әсер көрсетеді деп болжаймыз.

Процесті өткізгеннен кейін, түзілген нанобөлшектердегі метотрексаттың мөлшері есептелінді яғни, байланысу дәрежесі спектрофотометрлік әдіспен анықталды. Зерттеу нәтижелерін байланысу дәрежесінің дәрілік заттың концентрациясына тәуелділік диаграммасынан 3 суреттен көруге болады.

Диаграммадан дәрілік заттың концентрациясы артқан сайын, дәрілік заттың матрицаға енуі артатынын көреміз, яғни 35,0-67,0 %. Бұл енгізу әдісінің заңдылығына сәйкес келеді, яғни белсенді заттың мөлшері артқан сайын полимер матрицасы мүмкіндігінше максималды қабылдай алады.



Сур. 3. Метотрексаттың байланысу дәрежесінің концентрациясына тәуелділік диаграммасы

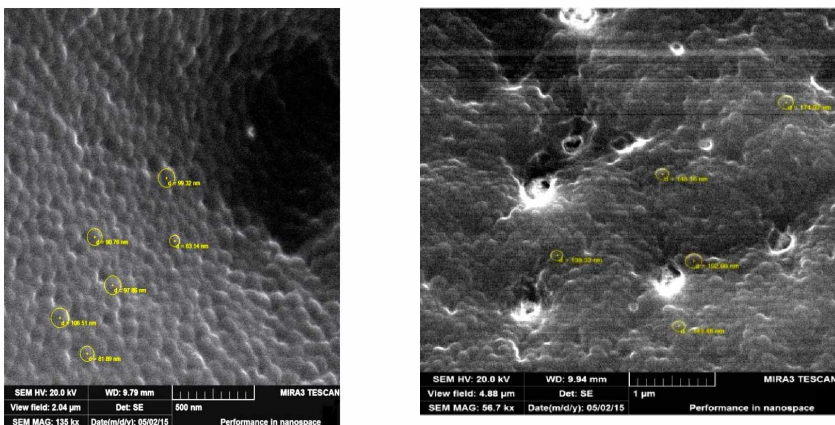
Фотонды корреляциялық спектроскопиямен алынған мәліметтерді растау үшін және нанобөлшектердің морфологиясын зерттеу мақсатында, бізбен дәрілік затпен иммобилденген нанобөлшектердің түсірілімдері трансмиссионды электронды микроскопта жасалды, ол келесі 4 суретте көрсетілген.

Келтірілген суреттерден көрініп тұрғандай, алынған бөлшектердің өлшемі өте кішкентай, яғни 50-190 нм аралығында және сфералық формада. Ісікті емдеуде қазіргі уақытта нанобөлшектердің өлшемі 10-100 нм болуы керек деп есептеледі. Капилляр қабырғасынан, филтрлеу коэффициентінің төменгі шегі бойынша есептелген, бүйректен шығарылған бөлшектердің диаметрі 10 нм шамасын құрайды. Жоғарғы шегі нақты анықталмаған, бірақ дәлелденген, жүздеген нанометр бөлшектердің диаметрі қан тамырларының қабырғасы арқылы өтіп, ісікте жиналады.

Тәжірбиелік мәліметтер бойынша күкіртті альбуминнің құрамында дәрісі бар енгізу әдісі бойынша синтезделген нанобөлшектің өлшемі 500 нм аспады, бұл ісікке қарсы препарат метотрексатты қолдануға мүмкіндік береді. Бізбен істелген жұмыстың



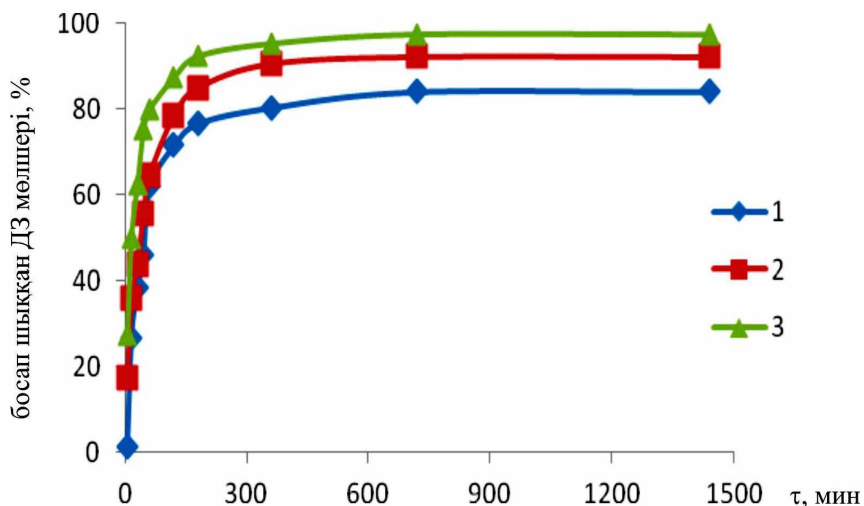
жалғасы ретінде күкіртті альбуминнің матрицасынан метотрексаттың босап шығуы зерттелді. Физиологиялық ерітіндіде УФ-спектрофотометрлік әдіспен анықталған әртүрлі концентрациядағы дәрілік заттың (0,001 г, 0,002 г, 0,003 г) полимерден босап шығу кинетикасы мен босап шығу дәрежесін анықтау нәтижелерін 5 суреттен көруге болады.



Сур. 4 Дәрілік затпен (0,002 г/мл (а) және 0,003 г/мл (б)) иммобилденген нанобөлшектердің түсірілімдері

Суретте келтірілген альбумин матрицасынан метотрексаттың босап шығу жылдамдығы алғашқы 1 сағат ішінде едәуір жоғары болды, 50-60 %. Әрі қарай дәрінің ортаға бөлінуі 6 сағатқа дейін баяу жүреді, одан кейін дәрілік заттың босап шығуы 24 сағатта барлық жағдайларда тоқтатылады, яғни дәрілік заттың шекті босап шығу дәрежесі дәрінің концентрациясынан тәуелді 84-97 % болды.

**Қорытынды.** Сонымен бұл зерттеуде бізбен еңгізу әдісімен ісікке қарсы дәрілік препарат метотрексатты тасымалдау үшін, күкіртті альбумин негізінде нанометрлік өлшемдегі полимерлі тасымалдағыштарды алу мүмкіндіктері көрсетілді. Бұл әдіспен алынған күкіртті альбуминді нанобөлшектен ісікке қарсы препарат метотрексаттың босап шығу кинетикасын зерттеу нәтиже-



Сур. 5. 0,003 г (3), 0,002 г (2) және 0,001 г (1) дәрілік затпен имобилизацияланған күкіртті альбумин нанобөлшегінің матрицасынан метотрексаттың босап шығуы

лері, нанобөлшектерге тігу процесі кезінде енгізу әдісімен имобилизацияланған дәрінің босап шығуы баяу жүретінін, яғни пролонгациялық әсер көрсететінін айқындады.

### Әдебиеттер

1 *Burkeev M.Zh., Zhaparova L.Zh. Tazhbaev E.M., Zhumagalieva T.S., Alex M. van Herk.* Synthesis and characterization of polyethyl cyanoacrylate nanoparticles loaded with capreomycin sulfate // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* – 2013. – Vol. 47 (3). – P. 154-156.

2 *Celikkeya E., Denkbaz E.B., Piskin E.* PLA/PEG copolymer particles. I. Preparation and characterization // *J. Appl Polym Sci.* – 1996. – Vol. 61. – P. 1439-1445.

3 *Taheri A., Fatemex A., Faranak S. et al.* Nanoparticles of Conjugated Methotrexate-Human Serum Albumin: Preparation and

Cytotoxicity Evaluations // J.Nanomaterials. – 2011. – № 6. – P. 1-7.

4 *Kratz F.* Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles // J. Cont. Rel. – 2008. – Vol. 132. – P. 171-183.

5 *Kreuter J., Ramge P., Petrov V. Hamm S., Gelperina S.E., Engelhardt B., Alyautdin R.* von Briesen, H & Begley D.J. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly( butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles// Pharmaceutical Research. – 2003. – Vol 20, № 3. – P. 409-416.

6 *Воронина Т.А., Трофимов С.С., Аляутдин Р.Н., Петров В.Е., Гельперина С.Э., Балабаньян В.Ю., Басел А.А.* Транспорт прозерина в головной мозг при помощи поли(бутил) цианоакрилатных наночастиц, покрытых полисорбатом-80 // Рос. мед. журн. – 2006. – № 4. – С. 28-327.

7 *Kurakhmaeva K.B., Djindjikhshvili I.A., Petrov V.E., Balabanyan V.U., Voronina T.A., Trofimov S.S., Kreuter J., Gelperina S.E., Begley D., Alyautdin R.N.* Brain targeting of nerve growth factor using poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles //Journal of Drug Targeting. – 2009. – Vol.17 (8). – P. 564-574.

8 *Weber C. Kreuter J., Langer K.* Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles // Int. J. Pharm. – 2000. – Vol. 196. – P. 197-200.

**Жұмағалиева Толқын Серғазықызы**, химия ғылымдарының кандидаты, e-mail: zhmagalieva79@mail.ru

**Бүркеев Мейрам Жүнісұлы**, химия ғылымдарының докторы, профессор

**Тажбаев Еркеблан Мұратұлы**, химия ғылымдарының докторы, профессор, Қарағанды e-mail: ktazhbaev@mail.ru

**Қажмұратова Ақерке Темирғалиевна**, химия және полимерлер кафедрасының доценті

**Мұханова Динара Амировна**, магистранты

**Арыстанова Жансауле Тулегеновна**, магистранты