

- 2 Doxakis E. Principles of miRNA-target regulation in metazoan models // *Int. J. Mol. Sci.* - 2013. - Vol. 14. - No. 8. - P. 16280-16302.
- 3 Zhou P., Xu W., Peng X., Luo Z., Xing Q., Chen X., *et al.* Large-Scale Screens of miRNA-mRNA Interactions Unveiled That the 3'UTR of a Gene Is Targeted by Multiple miRNAs // *PLoS One.* 2013. - Vol. 8. - No. 7. - P. e68204.
- 4 Hausser J., Syed A.P., Bilen B., *et al.* Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation // *Genome Res.* 2013. - Vol. 23. - No. 4. - P. 604-615.
- 5 Marín R.M., Sulc M., Vaníček J. Searching the coding region for microRNA targets // *RNA.* 2013. - Vol. 19. - No. 4. - P. 467-474.
- 6 Niemoeller O.M., Niyazi M., Corradini S., Zehentmayr F., Li M., Lauber K., Belka C. MicroRNA expression profiles in human cancer cells after ionizing radiation // *Radiat Oncol.* 2011. - Vol. 31. - No. 6. - P. 29.
- 7 Cazzoli R., Buttitta F., Di Nicola M., Malatesta S., Marchetti A., Rom W.N., Pass H.I. microRNAs Derived from Circulating Exosomes as Noninvasive Biomarkers for Screening and Diagnosing Lung Cancer // *J Thorac Oncol.* 2013. - Vol. 8. - No. 9. - P. 1156-1162.
- 8 Hidaka H., Seki N., Yoshino H., Yamasaki T., Yamada Y., Nohata N., *et al.* Tumor suppressive microRNA-1285 regulates novel molecular targets: aberrant expression and functional significance in renal cell carcinoma // *Oncotarget.* 2012. - Vol. 3. - No. 1. - P. 44-57.
- 9 Chen Z.H., Zhang G.L., Li H.R., Luo J.D., Li Z.X., *et al.* A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate.* 2012. - Vol. 72:1443-1452.
- 10 Issabekova A. Berillo O., Regnier M., Ivashchenko A. Interactions of intergenic microRNAs with mRNAs of genes involved in carcinogenesis // *Bioinformatics.* 2012. - Vol. 8. - No. 11. - P. 513-518.
- 11 Tan K.S., Armugam A., Sepramaniam S., Lim K.Y., Setyowati K.D., *et al.* Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients // *PLoS One.* 2009. - Vol. 4. - No. 11. - P. e7689.
- 12 Tian S., Huang S., Wu S., Guo W., Li J., He X. MicroRNA-1285 inhibits the expression of p53 by directly targeting its 3' untranslated region // *Biochem. Bioph. Research Comm.* 2010. - Vol. 396. - No. 2. - P. 435-439.

УДК 615.1:615.451:615.012.6:620.3:616-002.5

¹А.Н. Бекзат*, ²А.Б. Карабалин, ²С.А. Туткышбаев, ¹М.К. Гильманов

¹НИИ проблем биологии и биотехнологии, КазНУ имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

²Национальный Центр проблем туберкулеза МЗ РК, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: baltakay@mail.ru

Создание и испытание нового микрокапсулярного лекарственного препарата для эффективного лечения костного туберкулеза

Были разработаны комбинированные микрокапсулы, состоящие из фосфатидилинозитола (ФИ) и белка. Эти микрокапсулы были загружены этанбутолом, изониазидом, пиразинамидом и рифампицином. Морские свинки и кролики были заражены костным туберкулезом. Лечение опытных животных проводили наномазью содержащей микрокапсулы загруженные антибиотиками. Лечение наномазями дало лучший и более быстрый результат, чем лечения инъекционными антибиотиками. Количество антибиотиков в микрокапсулах и количество антибиотиков прошедших через кожно-мышечные покровы определяли с помощью HPLC хроматографии.

Ключевые слова: фосфатидилинозитол, ФИ микрокапсулы, микобактерии, тонкослойная хроматография, лечение костного туберкулеза

А.Н. Бекзат, А.Б. Карабалин, С.А. Туткышбаев, М.К. Гильманов

Сүйек туберкулезін эффективті емдеу үшін жаңа микрокапсулалар дәрілік препаратын жасау және сынау

Фосфатидилинозитол және протеиннен тұратын комбинирленген микрокапсулалар жасалынды. Бұл микрокапсулаларға этанбутол, изониазид, пиразинамид және рифампицин антибиотиктері жүктелінді. Жұмыс барысында америка торайлары және қояндар сүйек туберкулезімен жүктелінді. Сынама жануарларды емдеуге құрамында антибиотикпен жүктелген микрокапсулалары бар наномай қолданылды. Наномаймен емделу инъекциялық емдеу әдісіне қарағанда әлде қайда жақсы нәтижені көрсетті. HPLC хроматография арқылы микрокапсулалардың ішіндегі және тері мен бұлшықеттен өтетін антибиотиктердің мөлшері анықталды.

Түйін сөздер: фосфатидилинозитол, ФИ микрокапсулалар, микобактериялар, жұқа хроматография, сүйек туберкулезін емдеу

A.N Bekzat, A.B Karabalin, S.A Tutkyshbaev, M.K Gilmanov

Development and testing of a new microcapsular preparation for effective treatment of bone tuberculosis

The phosphatidylinositol (PI) and protein consisting combined microcapsules was developed. These microcapsules were loaded etanbutol, isoniazid, pyrazinamide, and rifampin. Guinea pigs and rabbits were infected by bone

tuberculosis. The therapy of experimental animals was performed by nanoointment which containing microcapsules loaded with antibiotics. Nanoointment therapy gave better and faster results than therapy by injectable antibiotics. The quantity of antibiotics in the microcapsules and the amount of antibiotics which were passed through the skin and muscle were determined by HPLC chromatography.

Keywords: phosphatidylinositol (PI), microcapsules, mycobacteria, thin layer chromatography, the therapy of tuberculosis of the bone.

По данным Организации Объединенных Наций и Всемирной организации здравоохранения более двух миллиардов человек, то есть около одной трети от общей численности населения Земли инфицированы микобактериями туберкулеза. Причем имеется полная вероятность того, что каждый десятый из них может заболеть этой болезнью в течение жизни [1].

Несмотря на разработку новых антибиотиков, эффективность борьбы с этим грозным заболеванием остается низкой [2]. Это можно объяснить следующими причинами. Во - первых, появляются формы туберкулеза, устойчивые к различным антибиотикам. Во - вторых, ввиду того, что лечение туберкулеза занимает очень длительное время, иногда до 2-3 лет, многие пациенты просто перестают лечиться. В - третьих, большая токсичность антитуберкулезных антибиотиков приводит к поражениям почек и печени, в результате чего пациенты приобретают новые патологии, что отрицательно сказывается на продолжительности лечения. Наиболее трудно излечивается костный туберкулез, так как антитуберкулезные антибиотики слабо проникают в костную ткань и поэтому лечение затягивается на годы, а сам костный туберкулез приводит к инвалидизации пациента.

Таким образом, перед учеными стоит очень важная и актуальная задача резкого повышения эффективности лечения костного туберкулеза. Эта борьба осложняется тем, что каждый больной туберкулезом должен ежедневно получать таблетки или инъекции сразу четырех очень токсичных антибиотиков первой или второй линии. При применении этих антибиотиков, они токсически воздействуют на все клетки организма, и лишь сотая доля этих антибиотиков оказывает терапевтический эффект на инфицированный орган.

Принимая во внимание очень высокую токсичность используемых антибиотиков и продолжительность лечения, имеется острая необходимость в создании принципиально новых лекарств для лечения костного туберкулеза. Эту задачу можно решить только на основе достижений нанотехнологии. Поэтому наибольшую перспективу для лечения костного туберкулеза имеют наносистемы прямой доставки лекарств в инфицированный орган.

В настоящее время существуют два типа систем доставки лекарственных средств. Первая из них - это системы, выполненные из натуральных биосовместимых веществ, а вторая - это наносистемы, выполненные из искусственных полимеров. Наиболее известная и широко используемая система транспорта лекарств из биосовместимых веществ это липосомы, изготовленные на основе лецитина. Однако, ввиду большой гидрофобности, лецитиновые липосомы склонны к слипанию и агрегации, что создает опасность тромбоза не только мелких, но и даже крупных кровеносных сосудов. В тоже время, нанокапсулы из полимерных материалов не слипаются. Но, так как липосомы изготовлены из бионесовместимого, чужеродного материала, они вызывают различные иммунные, аллергические и пирогенные реакции организма. Недостатком полимерных нанокапсул является и то, что лекарства освобождаются из них с трудом, и этот процесс занимает большое время. Все вышеуказанные недостатки обеих типов систем транспорта обусловили то, что они до сих пор в медицине для лечения пациентов практически не применяются. В основном они используются для проведения опытов на модельных системах и на животных.

Учитывая всё выше сказанное, является весьма актуальной разработка принципиально новой системы доставки лекарств в инфицированную костную ткань, которая имела бы наноразмеры, была бы выполнена из биосовместимого материала и была бы не способной к агрегации. Поэтому целью нашего исследования явилось создание и испытание нового микрокапсулярного лекарственного препарата для эффективного лечения костного туберкулеза.

Материалы и методы

Объектом исследования служили комбинированные микрокапсулы, изготовленные из фосфатидилинозитола (ФИ) и белка. В работе использовались следующие материалы: половозрелые

самцы морских свинок (*Cavia porcellus*) и кроликов (*Oryctolagus cuniculus*). ФИ получали из беззародышевых половинок покоящегося зерна мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) сорта «Стекловидная-24». ФИ экстрагировали реактивом Фолча, смесью хлороформ-метанол, в соотношении 2:1 [3].

В работе использовались следующие методы. Содержание основных элементов С, N, O, P, S в материале проводили с помощью рентгеноанализатора элементов, типа INCA-X-Ray analytical system – Oxford (Англия). Для анализа фосфолипидного компонента использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) на пластинках типа «Силуфол» (Kavalier, Чехия) и на целлюлозных пластинках (Merck, Германия) в двух системах растворителей:

- 1) хлороформ : метанол: аммиак (35:60:5);
- 2) хлороформ : метанол : уксусная кислота : вода (50:25:8:4) [3].

Для анализа белкового компонента был использован SDS – электрофорез по методу Laemmli [4]. Концентрацию белка определяли по методу Бэйли при длине волны 330 нм на спектрофотометре типа Ultraspec 1100 pro, Amersham-Bioscience [5]. Для определения белка мы также использовали метод Брэдфорда [6]. В работе был использован метод сканирующей электронной микроскопии с помощью сканирующего электронного микроскопа, типа JOEL SUPER PROBE 733 (Япония). На микроскопическую стеклянную пластину наносили 1 каплю препарата сферосом и помещали в вытяжной шкаф для полного высушивания. Затем пластина помещалась в аппарат ion sputter (fine coat) (JFC-1100) при напряжении 1000 В и при вакууме 10^{-3} мм рт. ст. на 30 минут для покрытия сферосом тонким слоем золота. Подготовленные образцы исследовали в электронном микроскопе.

Все результаты были подвергнуты стандартной статистической обработке. Используемые в работе приборы отвечают требованиям современной метрологии.

Результаты и их обсуждение

Для формирования липосом раствор, содержащий фосфатидилинозитол, впрыскивали с помощью шприца в буферный раствор и подвергали ультразвуковому диспергированию на ультразвуковом дезинтеграторе типа UD-11 (Techpan, Poland) в течение 5 мин. В результате диспергирования формировались липосомы - шарообразные фосфатидилинозитольные структуры размером около 1 мкм. Для получения комбинированных микрокапсул полученные ФИ - липосомы смешивали с раствором белка который получали по способу, описанному в патенте. Для загрузки комбинированных микрокапсул антитуберкулезными антибиотиками использовали свойство микрокапсул раскрываться в гидрофобной фазе, как это видно на рисунке, а затем схлопываться при переводе их в буферный раствор. В буферном растворе раскрытые микрокапсулы начинают закрываться, захватывая внутрь себя буферный раствор с растворенными в нем антибиотиками. Загрузка была осуществлена по методу, описанному в патенте [7]. Для загрузки использовались следующие антибиотики: изониазид, пиразинамид и этамбутол. Также были получены микрокапсулы, загруженные рифампицином, загрузка этим антибиотиком отличалась от загрузки тремя другими. Полученные растворы с загруженными антибиотиками смешивались в равной пропорции с гелем, полученным из растения Алоэ вера. Таким образом, нами были получены два вида наномази для лечения костного туберкулеза.

Опытных животных – морских свинок и кроликов заражали туберкулезом путем ведения суспензии бактерии *Micobacterium tuberculosis* с помощью шприца, вводя бактерии в бедренную кость опытных животных. Развитие костного туберкулеза наблюдали с помощью рентгенологического контроля. Содержание противотуберкулезных антибиотиков внутри микрокапсулы определяли следующим образом. Раствор загруженных микрокапсул экстрагировали реактивом Фолча (смесь хлороформ-метанол 2:1). При экстракции ФИ микрокапсул растворялся в реактиве Фолча, а находящиеся в микрокапсулах антибиотики переходили в верхнюю водную фазу, которую отделяли с помощью делительной воронки. Концентрацию отдельных антибиотиков определяли с помощью хроматографии высокого давления (HPLC) на жидкостном хроматографе типа Waters 600 (США). Для определения количества антибиотиков в микрокапсулах были построены калибровочные графики. Разделение проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения фирмы Waters «EmpowerII». Калибровочные графики для каждого антибиотика получали в результате анализа проб стандарта определяемого соединения.

Было установлено, что в 1 мл суспензии микрокапсул в среднем содержится от 10 до 20 мкМ каждого из 4-х антибиотиков.



Рисунок 1 - Графическое представление изменения концентрации этимбутола в лимфе животного от времени при однократном применении нагруженных микрокапсул

Полученные результаты говорят о том, что противотуберкулезные антибиотики практически без потерь проходят через кожный барьер и количественно доставляются к месту инфицирования. Было изучено количество доставляемого через кожные барьеры антибиотика с помощью микрокапсул. Для этого были изготовлены катетеры, которые собирали подкожную лимфу. В этой лимфе определялось содержание антибиотиков, прошедших через кожу. Эти катетеры размещались вблизи инфицированного органа. Для лечения зараженных костным туберкулезом животных шерсть на месте заражения сбрасывали. Это место ежедневно три раза в сутки (утром, днем и вечером) смазывали наномазью содержащей микрокапсулы. В нашей работе впервые с помощью высокочувствительного хроматографического метода были определены концентрации антибиотиков в подкожной лимфе *in situ* бедра животного. Это позволяет нам определять количество доставляемого антибиотика на место инфицированной кости. Результаты представлены на рисунке 1.

Контрольных животных, также зараженных костным туберкулезом, лечили традиционным методом с помощью инъекций теми же антибиотиками. Было установлено, что излечение опытных животных с помощью наномазей наступало на 1 месяц раньше, чем при лечении инъекционным способом, которое занимало 3 месяца. Таким образом, была подтверждена высокая эффективность лечения модельного костного туберкулеза морских свинок и кроликов с помощью микрокапсул нагруженных антибиотиками.

В чем же секрет высокой эффективности терапии костного туберкулеза микрокапсулами? Все дело в том, что клетки кожи и мышц имеют слабый отрицательный заряд, в результате чего микрокапсулы отталкиваются от этих клеток, не проникая в них. Под силами гравитации и электростатического отталкивания микрокапсулы в течение десяти минут достигают инфицированные кости, а благодаря наличию фосфатидилинозитольной мембраны, микрокапсулы без труда проникают внутрь бактериальных клеток и находящиеся в них антибиотики быстро убивают микобактерий туберкулеза.

Литература

1. Департамент "Остановить туберкулез", ВОЗ. Руководство по программному ведению лекарственно-устойчивого туберкулеза 2006 г. , 217с.
2. Информационный бюллетень №104. Туберкулез // ВОЗ, Март 2013 г.
3. Кейтс М. Техника липидологии. - М. - 1975
4. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature. - 1970. - 227: P. 680-685
5. Бэйли Дж. Методы химии белков: Пер. с англ. - М.: Мир, 1965. - 284 с.
6. Bradford M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // Anal. Biochem. -1976, Vol 72. -P. 248-254.
7. Саменов Н.А., Гильманов М.К., Гильманова С.М. // Способ загрузки липосом // Предварительный патент РК №17043 от 16.01.2006. Заявка №2004/1191.1 РК. - 17.08.2004.