

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ pH ИЗ НОСИТЕЛЯ НА ОСНОВЕ МИКРОЧАСТИЦ Fe(0)

С.С. Власов

аспирант, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ; технолог, Центр внедрения технологий ЦНИЛ, СибГМУ (г. Томск, Россия)
E-mail: unreal800@gmail.com

А. Ди Мартино

Ph.D., науч. сотрудник, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ (г. Томск, Россия); мл. науч. сотрудник, Центр полимерных систем, Университет Томаша Бати (г. Злин, Чешская Республика)

М.С. Юсубов

д.х.н., профессор, директор Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ; гл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ (г. Томск, Россия);

А.М. Гурьев

д.фарм.н., руководитель Центра внедрения технологий, ЦНИЛ, СибГМУ (г. Томск, Россия);

С.В. Кривошеков

мл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ (г. Томск, Россия)

Е.В. Свиридова

аспирант, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ (г. Томск, Россия)

П.С. Постников

к.х.н., доцент, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ (г. Томск, Россия)

М.В. Белоусов

д.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ (г. Томск, Россия)

Исследовано высвобождение доксорубина из носителя на основе микрочастиц ноль-валентного железа (Fe(0)) при различных значениях pH. Проведено изучение влияния ультразвукового излучения на скорость высвобождения доксорубина. Сделан вывод о возможности рассмотренной системы доставки лекарственных средств на основе микрочастиц Fe(0) в качестве средства для контролируемого высвобождения доксорубина.

Ключевые слова: доксорубин, хитозан, микрочастицы ноль-валентного железа.

Для цитирования: Власов С.С., Ди Мартино А., Юсубов М.С., Гурьев А.М., Кривошеков С.В., Свиридова Е.В., Постников П.С., Белоусов М.В. Изучение кинетики высвобождения доксорубина под воздействием ультразвукового излучения при различных значениях pH из носителя на основе микрочастиц Fe(0). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019; 22(5):15–19. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-05-03>

Несмотря на то, что химиотерапия является одним из основных и наиболее эффективных методов консервативного лечения злокачественных новообразований, ее применение по-прежнему ограничивается серьезными побочными эффектами, возникающими за счет отсутствия специфичности химиотерапевтических агентов [1]. Наиболее эффективным способом решения данной проблемы является использование систем доставки лекарственных средств (СДЛС), которые помимо снижения частоты возникновения побочных эффектов позволяют применять новые, более эффективные

режимы лечения онкологических заболеваний [2]. Основными препятствиями достижения максимальной эффективности проводимой терапии с использованием СДЛС являются невозможность контролируемого высвобождения химиотерапевтического агента и низкая емкость загрузки.

В связи с этим разработка новых СДЛС, которые, с одной стороны, позволяют контролируемо высвобождать химиотерапевтический агент, с другой – транспортировать его в высоких количествах непосредственно к органам-мишеням, является актуальным направлением фармацевтической химии.

В последнее десятилетие наибольший интерес сфокусирован на использовании ультразвукового излучения (УЗ) в качестве внешнего пускового механизма для высвобождения лекарственных средств [3]. Преимуществами данного подхода являются неинвазивность, безопасность, а также постоянный и контролируемый профиль концентрации лекарственного средства с благоприятной фармакокинетикой [4].

Цель работы – получение новой СДЛС на основе поверхностно-модифицированных микрочастиц ноль-валентного железа (Fe(0)) с высокой емкостью загрузки доксорубина и возможностью его контролируемого высвобождения под воздействием внешних (УЗ-излучение) и внутренних (значения pH окружающей среды) факторов.

Более того, за счет лучших магнитных свойств ноль-валентного железа по сравнению с оксидами железа, СДЛС на его основе могут быть использованы для проведения гипертермической терапии, а микронные размеры позволяют решать задачи локальной эмболизации опухоли [5].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований были использованы реагенты и органические растворители, являющиеся товарными продуктами фирм «Aldrich» (США), «Fluka» и др., соответствующей чистоты (содержание основного компонента не менее 98%), которые использовались без предварительной очистки. Дзета-потенциал и размеры микрочастиц определяли на приборе Zetasizer Nano ZS («Malvern», Великобритания). В эксперименте использовали водную суспензию с концентрацией 1 мг/мл (pH=7). Доказательство ковалентного присоединения органических функциональных групп на микрочастицы железа (Fe-COOH) оценивали методом ИК-спектроскопии на приборе Nicolet iS5 Infrared Spectrometer («Thermo Scientific», США).

Методика синтеза 4-карбокситетрагидропиридина тозилата. Синтез осуществляли в соответствии с методикой [6].

Методика синтеза микрочастиц Fe-COOH и конъюгата Fe-CS-DOX. Синтез микрочастиц железа проводили по модифицированному методу синтеза, разработанному ранее [7]. Хлорид железа (III) (1,05 г, 6,5 ммоль) и натрия боргидрид (0,441 г, 11,7 ммоль) по отдельности растворяли в 30 мл дистиллированной воды. Далее в трехгорлой колбе в атмосфере аргона смешивали по 15 мл приготовленных растворов. Перемешивание осуществ-

ляли в течение 10 мин с использованием механической мешалки. Затем к полученной смеси добавляли оставшиеся 15 мл растворов хлорида железа (III) и натрия боргидрида и снова перемешивали в течение 10 мин. К полученной реакционной массе приливали водный раствор 4-карбокситетрагидропиридина тозилата (1,2%, 60 мл) и продолжали перемешивание в течение еще 30 мин. Полученные микрочастицы Fe-COOH выделяли из смеси путем осаждения с помощью неодимового магнита и последовательно промывали водой, этанолом и ацетоном до достижения прозрачного раствора над частицами. Далее выделенные микрочастицы осаждали с использованием неодимового магнита, после чего супернатант удаляли методом декантирования, а полученные микрочастицы Fe-COOH высушивали от остаточных органических растворителей в потоке азота в течение 15 мин.

На следующем этапе осуществляли получение конъюгата Fe-CS-DOX, используя измененный метод [8]. Полученные микрочастицы Fe-COOH повторно суспендировали в 14 мл дистиллированной воды. Параллельно готовили водный раствор доксорубина (40 мл, 1 мг/мл) и раствор хитозана (80 мл, 0,4 мг/мл) в воде с добавлением уксусной кислоты до достижения значения pH, равного 4–5. Растворение хитозана (CS) проводили при интенсивном перемешивании и температуре 40 °C. К раствору хитозана по каплям добавляли раствор доксорубина и оставляли при перемешивании на 10 мин. Полученную смесь CS/DOX медленно прибавляли к суспензии микрочастиц Fe-COOH и оставляли перемешиваться в течение 2 ч, после чего всю реакционную массу центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отделяли от осадка (Fe-CS-DOX) методом декантирования и оставляли для определения емкости загрузки. Образовавшийся конъюгат Fe-CS-DOX высушивали лиофильно.

Эффективность инкапсуляции (EE) и емкость загрузки (LC) доксорубина рассчитывали по следующим уравнениям:

$$EE(\%) = \left(\frac{Mf_{DOX}}{Mt_{DOX}} \right) \cdot 100; LC(\text{мг} / \text{мг}) = \frac{Mf_{DOX}}{M_{MP}},$$

где Mf_{DOX} – масса доксорубина, загруженного на микрочастицы; Mt_{DOX} – масса доксорубина, взятая для загрузки; M_{MP} – масса взятых микрочастиц.

Количественное содержание DOX в супернатанте определяли методом УФ-спектроскопии при

длине волны 480 нм на спектрофотометре Evolution 201/220 UV-Visible Spectrophotometers («Thermo Scientific», США). Расчет концентрации выполняли по калибровочной прямой в диапазоне концентраций растворов DOX от 1,172 до 150,0 мкг/мл.

Изучение высвобождения доксорубина проводили в инкубаторе Stuart SI 500 («Stuart», Великобритания) при постоянной температуре 37 °С, перемешивании 100 об/мин и значениях pH, равных 3,3; 5,5; 7,4. Для осуществления эксперимента готовили 10 мл суспензии конъюгата с концентрацией 1 мг/мл. В качестве растворителя использовали смесь KCl/HCl со значением pH 3,3. Исследуемый образец помещали в инкубатор и через определенные промежутки времени проводили отбор проб, после чего центрифугировали при 7500 об/мин в течение 5 мин, затем спектрофотометрировали супернатант. Отобранный объем замещали эквивалентным объемом свежего раствора KCl/HCl и продолжали изучение высвобождения. Изменение значений pH также проводили в определенные промежутки времени непосредственно в анализируемом растворе путем добавления 0,1 М раствора натрия гидроксид до достижения необходимого значения.

Высвобождение доксорубина под воздействием ультразвука изучали параллельно при условиях, аналогичных описанным выше. В качестве источника ультразвукового излучения использовали ультразвуковую ванну Elmasonic S10N («Elma», Германия). Особенностью данной методики является внесение исследуемого образца в ультразвуковое поле с частотой 75 кГц и удельной мощностью 2 Вт/см² на 30 с. Обработку ультразвуком осуществляли непосредственно перед центрифугированием и отбором проб.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученная система представляет собой конъюгат из частиц микронных размеров (рис. 1), ядро которого состоит из ноль-валентного железа с модифицированной поверхностью. К поверхности ядра за счет электростатических взаимодействий обеспечивается присоединение доксорубина и низкомолекулярного хитозана для повышения стабильности системы.

Характеристика микрочастиц. Эксперименты по определению размеров микрочастиц железа (Fe(0), Fe-COOH и Fe-CS-DOX) показали отсутствие значимой дисперсии результатов в ходе модификации и конъюгации (таблица).

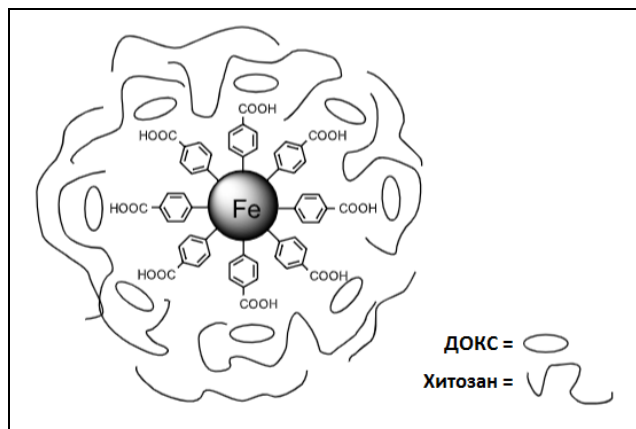


Рис. 1. Схематическое изображение конъюгата Fe-CS-DOX

Таблица. Размер и дзета-потенциал микрочастиц

Название образца	Размер частиц, мкм	Дзета-потенциал, мВ
Fe(0)	4,19±0,12	-0,03±0,01
Fe-COOH	4,32±0,18	-18,92±0,81
Fe-CS-DOX	4,43±0,21	-9,07±0,46

Отрицательное значение дзета-потенциала для микрочастиц Fe-COOH объясняется наличием карбоксильных групп на их поверхности. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о ковалентной модификации поверхности микрочастиц 4-карбоксихенильными группами.

Для конъюгата Fe-CS-DOX наблюдается значительный сдвиг дзета-потенциала в положительную сторону. Это объясняется присутствием в его структуре положительно заряженных молекул доксорубина и хитозана.

Смещение дзета-потенциала в положительную сторону свидетельствует о прохождении процесса конъюгации.

Подтверждение ковалентного присоединения 4-карбоксихенильных групп к поверхности микрочастиц ноль-валентного железа осуществляли методом ИК-спектроскопии (рис. 2).

На спектре микрочастиц ноль-валентного железа (Fe(0)) наблюдаются полосы поглощения при ν_{OH} 3422 и 1637 см⁻¹, которые характеризуют колебания -ОН группы воды, адсорбированной на поверхности, что, в свою очередь, предполагает формирование оксидного слоя на поверхности микрочастиц.

На спектре микрочастиц Fe-COOH, наблюдаются полосы поглощения в диапазоне ν_{OH} 3000–2500 см⁻¹, что указывает на присутствие

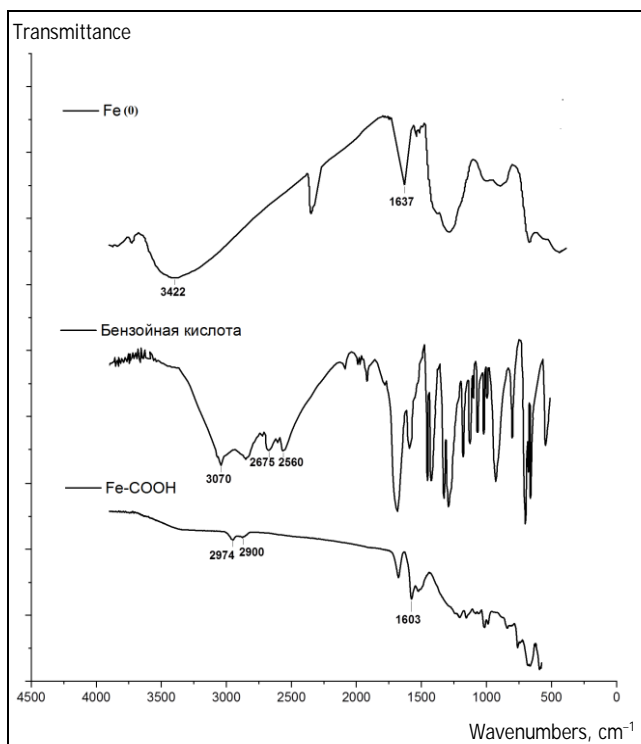


Рис. 2. ИК-спектры микрочастиц Fe(0), бензойной кислоты, Fe-COOH

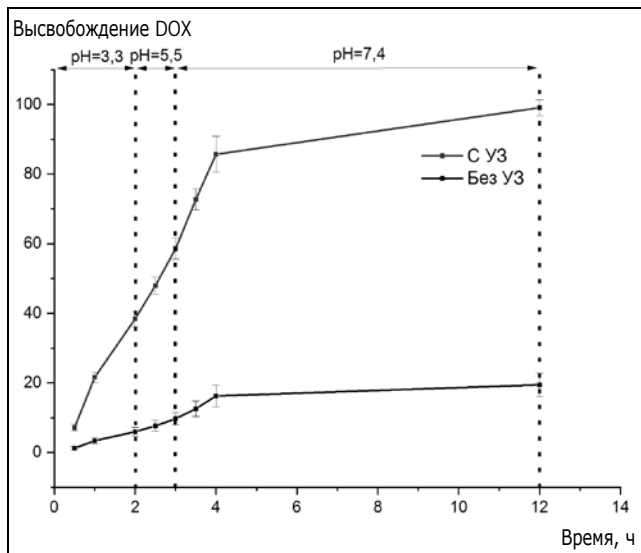


Рис. 3. График высвобождения доксорубина из конъюгата Fe-CS-DOX

карбоксильной группы (–COOH) и отдельный пик поглощения при ν_{C-C} 1603 cm^{-1} , подтверждающий присутствие бензольного кольца. Таким образом, полученные результаты могут подтверждать присоединение 4-карбоксифенильных групп к поверхности микрочастиц [9].

Изучение высвобождения доксорубина.

Расчет концентрации доксорубина производили по уравнению калибровочной прямой:

$$\text{Концентрация (мкг / мл)} = \frac{\text{Abs} - 0,0189}{0,0171},$$

где Abs – поглощение анализируемого образца.

Коэффициент корреляции $R^2 = 0,999$.

Перед изучением высвобождения доксорубина была определена эффективность инкапсуляции (EE) и емкость загрузки (LC), которые составили 54% и 0,54 мг доксорубина на 1 мг микрочастиц соответственно.

Результаты эксперимента по изучению высвобождения доксорубина под воздействием ультразвука и без него приведены на рис. 3.

Как следует из результатов эксперимента, ультразвуковое излучение оказывает существенное влияние на увеличение скорости высвобождения доксорубина из конъюгата вне зависимости от значения pH. Данный факт объясняется возникновением колебательных движений среды высвобождения, вследствие чего происходит разрушение электростатических взаимодействий в конъюгате.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования разработанной системы в качестве средства для контролируемого высвобождения доксорубина.

ВЫВОДЫ

1. Изучено высвобождение доксорубина из носителя, на основе микрочастиц Fe(0) при различных значениях pH и подтверждено влияние ультразвукового излучения на изменение кинетики высвобождения (более чем в 4 раза, через 12 ч после начала эксперимента). Емкость загрузки доксорубина и среднее значение размера микрочастиц составили 0,54 мг/мг и 4,43 мкм соответственно.
2. Рассмотренная система Fe-CS-DOX оставляет большие перспективы для дальнейшего использования в качестве носителя лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Liu F.S. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy – A quick review // J. Obstet. Gynecol. 2009; 48:239–244.
2. Prasanna N.R., Triveni C., Soumya R., Ramana B.V., Nagarahan G. Novel Delivery Systems in Cancer Chemotherapy // Research & Reviews in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2013; 2(1):8–19.

3. Chen M., Xu A., He W., Ma W., Shen S. Ultrasound triggered drug delivery for mitochondria targeted sonodynamic therapy // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2017; 39:501–507.
4. Deelman L.E., Declèves A.E., Rychak J.J., Sharma K. Targeted renal therapies through microbubbles and ultrasound // *Advanced drug delivery reviews.* 2010; 62(14):1369–1377.
5. Crane N.B. Strengthening Porous Metal Skeletons by Metal Deposition From a Nanoparticle Dispersion. Massachusetts Institute of Technology. Dept. of Mechanical Engineering. Massachusetts., 2006. 237 p.
6. Filimonov V.D., Trusova M.E., Postnikov P.S., Krasnokutskaya E.A., Lee Y.M., Hwang H.Y., Kim H., Chi K-W. Unusually Stable, Versatile, and Pure Arene diazonium Tosylates: Their Preparation, Structures, and Synthetic Applicability // *Org. Lett.* 2008; 10:3961–64.
7. Gusel'nikova O.A., Galanov A.I., Gutakovskii A.K., Postnikov P.S. The convenient preparation of stable aryl-coated zerovalent iron nanoparticles // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2015; 6:1192–1198.
8. Di Martino A., Guselnikova O.A., Trusova M.E., Postnikov P.S., Sedlarik V. Organic-inorganic hybrid nanoparticles controlled delivery system for anticancer drugs // *Int. J. Pharm.* 2017; 526(1–2):380–390.
9. Chehimi M.M., Lamouri A., Picot M., Pinson J. Surface modification of polymers by reduction of diazonium salts: polymethylmethacrylate as an example // *J. Mater. Chem. C.* 2014; 2:356–363.

Поступила после доработки 26 января 2019 г.

INVESTIGATION OF RELEASE KINETICS OF DOXORUBICIN FROM DRUG CARRIER BASED ON Fe(0) MICROPARTICLES UNDER INFLUENCE OF ULTRASOUND IRRADIATION AND DIFFERENT VALUES OF pH

© Authors, 2019

S.S. Vlasov

Post-graduate Student, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences of Tomsk Polytechnic University; Production Engineer, Technology Implementation Centre, Central Scientific Research Laboratory, Siberian State Medical University (Tomsk)
E-mail: unreal800@gmail.com

A. Di Martino

Ph.D., Research Scientist, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences of Tomsk Polytechnic University; Junior Research Scientist, Centre of Polymer Systems, Tomas Bata University (Zlin, Czech Republic)

M.S. Yusubov

Dr.Sc. (Chem.), Professor, Headmaster of Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, Tomsk Polytechnic University; Chief Research Scientist, Central Scientific Research Laboratory, Siberian State Medical University (Tomsk)

A.M. Guryev

Dr.Sc. (Pharm.), Head of Technology Implementation Centre, Central Scientific Research Laboratory, Siberian State Medical University (Tomsk)

S.V. Krivoschekov

Junior Research Scientist, Central Scientific Research Laboratory, Siberian State Medical University (Tomsk)

E.V. Sviridova

Post-graduate Student, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, Tomsk Polytechnic University

P.S. Postnikov

Ph.D. (Chem.), Associate Professor, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, Tomsk Polytechnic University

M.V. Belousov

Dr. Sc. (Pharm.), Head of Department of Pharmaceutical Analysis, Siberian State Medical University (Tomsk)

Aim. To obtain new drug carrier for doxorubicin based on modified Fe(0) microparticles and evaluate its release kinetics under influence of different values of pH and ultrasound irradiation. **Material and methods.** Size and zeta-potential of microparticles were determined on Zetasizer Nano ZS. Surface modification (covalent binding of residues of benzoic acid) was confirmed by FTIR spectroscopy. Encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC) of doxorubicin (DOX) was determined by UV spectroscopy (480 nm). Release studies were carried out in Stuart SI 500 incubator at a constant temperature (37 °C), stirring rate (100 rpm) and different pH values (3.3; 5.5; 7.4). For investigation of influence of ultrasound (US) irradiation on the release kinetics ultrasound field with frequency and power 75 kHz and 2 W/cm² respectively was used. Ultrasonic bath Elmasonic S10H was used as a source of ultrasound irradiation. **Results and discussions.** Size and zeta-potential of Fe-CS-DOX conjugate were 4.43 and -9.07 respectively. Loading capacity of doxorubicin was 0.54 mg/mg. Percentage of released drug with and without US irradiation were 96 and 18% respectively (in 12 hours after starting of the experiment). **Conclusion.** In this study, the release of doxorubicin from drug carrier, based on Fe (0) microparticles at different pH values was investigated and the influence of ultrasound irradiation on the release kinetics was confirmed. In 12 hours after starting of the release, the amount of released drug was increased more than 4 times. So, the obtained conjugate Fe-CS-DOX leaves great promise for its further use as a drug carrier.

Key words: doxorubicin, chitosan, iron zero-valent microparticles.

For citation: Vlasov S.S., Di Martino A., Yusubov M.S., Guryev A.M., Krivoschekov S.V., Sviridova E.V., Postnikov P.S., Belousov M.V. Investigation of release kinetics of doxorubicin from drug carrier based on Fe(0) microparticles under influence of ultrasound irradiation and different values of pH. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2019;22(5):15–19. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-05-03>