

Разработка и свойства нового носителя доксорубина на основе поверхностно-модифицированных микрочастиц ноль-валентного железа с высокой эффективностью инкапсуляции и возможностью его контролируемого высвобождения

Ди Мартино А.^{1,3}, Власов С.С.^{1,2}, Гурьев А.М.², Юсубов М.С.^{1,2},
Постников П.С.^{1,4}, Белоусов М.В.^{1,2}

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

² Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³ Университет Томаша Бати в Злине
Чешская Республика, 760 01, г. Злин, пр. Томаша Бати, 5678

⁴ Высшая школа химической технологии
Чешская Республика, 166 28, г. Прага, пр. Технический, 5

РЕЗЮМЕ

В настоящее время химиотерапия в сочетании с хирургией и лучевой терапией является наиболее эффективным методом лечения рака. В то же время применение данного метода сопровождается серьезными побочными эффектами, обусловленными неспецифичностью большинства химиотерапевтических агентов. В связи с этим разработку систем доставки лекарственных средств (СДАС), способных обеспечить адресацию химиотерапевтического агента к раковым клеткам, а также его контролируемое высвобождение представляют собой перспективный подход для эффективного лечения онкологических заболеваний.

Цель работы – синтез нового СДАС на основе поверхностно-модифицированных микрочастиц ноль-валентного железа, изучение его свойств в качестве носителя химиотерапевтического агента (эффективность инкапсуляции, емкость загрузки, возможность контролируемого высвобождения химиотерапевтического агента) и безопасности.

Материалы и методы. Частицы были получены методом восстановления хлорида железа (III) боргидридом натрия с последующей *in situ* модификацией поверхности 4-карбоксібенолдиазония тозилатом согласно модифицированной методике. Наличие функциональных групп на поверхности подтверждали методом ИК-спектроскопии с использованием спектрометра Nicolet iS5 Infrared Spectrometer (Thermo Scientific, США). Размеры и поверхностный заряд микрочастиц в растворе исследовали методом динамического рассеяния света и дзета-потенциала. Для оценки влияния pH окружающей среды на скорость высвобождения доксорубина исследование проводили в моделированных физиологических условиях (pH 3,3; 5,5; 7,4). Изучение высвобождения под воздействием ультразвукового поля проводили одновременно при тех же условиях. Влияние модификации поверхности на эффективность инкапсуляции оценивали при различных значениях pH (3,3; 5,5; 7,4) и концентрациях доксорубина (0,2; 0,35; 0,5; 0,75; 1,0 мг/мл). Для подтверждения безопасности разработанной СДАС определение цитотоксичности проводили на клеточной линии HeLa (ATCC® CCL-2™).

Результаты. Предложена оригинальная методика получения носителя на основе микрочастиц ноль-валентного железа с ковалентно присоединенным к поверхности хитозаном (Fe-CS), обладающе-

✉ Власов Сергей Сергеевич, e-mail: unreal800@gmail.com.

го высокими значениями эффективности инкапсуляции и емкости загрузки доксорубина (0,9 мг на 1 мг микрочастиц Fe-CS), низкой цитотоксичностью, а также возможностью контролируемого высвобождения цитостатического агента (доксорубина) под воздействием ультразвукового излучения при различных значениях pH.

Заключение. Получен носитель на основе микрочастиц ноль-валентного железа с ковалентно присоединенным к поверхности хитозаном (Fe-CS). Определена эффективность инкапсуляции, емкость загрузки доксорубина и подтверждена возможность его контролируемого высвобождения под воздействием ультразвукового поля при различных значениях pH. В эксперименте *in vitro* на клеточной линии HeLa (ATCC® CCL-2™) установлено отсутствие токсичности для всех образцов (Fe⁰, Fe-COOH и Fe-CS) вне зависимости от их концентрации.

Ключевые слова: доксорубин, хитозан, микрочастицы ноль-валентного железа, доставка лекарственных средств, стимул-чувствительный носитель, контролируемое высвобождение.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке проекта развития ТПУ.

Для цитирования: Ди Мартино А., Власов С.С., Гурьев А.М., Юсубов М.С., Постников П.С., Белосусов М.В. Разработка и свойства нового носителя доксорубина на основе поверхностно-модифицированных микрочастиц ноль-валентного железа с высокой эффективностью инкапсуляции и возможностью его контролируемого высвобождения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 69–79. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-69-79>.

УДК 615.277.3.015.14:546.72-022.532

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-69-79>

Development and properties of a new doxorubicin carrier based on surface-modified iron zero-valent microparticles with high encapsulation efficiency and the possibility of its controlled release

Di Martino A.^{1,3}, Vlasov S.S.^{1,2}, Guryev A.M.², Yusubov M.S.^{1,2}, Postnikov P.S.^{1,4}, Belousov M.V.^{1,2}

¹ National Research Tomsk Polytechnic University (NR TPU)
30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

² Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moscow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Tomas Bata University in Zlin
5678, Tr. Tomas Bata Zlin, 760 01, Czech Republic

⁴ University of Chemistry and Technology
166 28 Prague, Czech Republic

ABSTRACT

Currently, chemotherapy combined with surgery and radiation therapy is the most effective treatment for cancer. At the same time, the use of this method is accompanied by serious side effects caused by the lack of specificity of most chemotherapeutic agents. In this regard, the development of drug delivery systems (DDS) capable of addressing a chemotherapeutic agent to cancer cells, as well as its controlled release, is a promising approach for the effective treatment of cancer.

The aim of the study is to synthesize a new DDS based on surface-modified microparticles of zero-valent iron, to study its properties as a carrier of a chemotherapeutic agent (encapsulation efficiency, loading capacity, possibility of controlled release of a chemotherapeutic agent) and safety.

Materials and methods. The microparticles were synthesised by reduction of iron (III) chloride with sodium borohydride followed by *in situ* surface modification by 4-carboxybenzyl diazonium tosylate. To confirm the occurrence of the reaction, FTIR spectroscopy (Nicolet iS5 Infrared Spectrometer (Thermo Scientific, USA)) was used. Hydrodynamic diameter and surface charge of the microparticles in solution were investigated by dynamic light scattering (DLS) and z-potential. DOX release studies were performed in simulated physiological conditions (pH 3.3; 5.5; 7.4) to evaluate the effect of the external pH on the release rate. Release studies under ultrasound irradiation were performed simultaneously in the same conditions. The effect of surface modification on encapsulation efficiency was evaluated at various pH values (3.3; 5.5; 7.4) and doxorubicin concentrations (0.2; 0.35; 0.5; 0.75; 1.0 mg/ml). To demonstrate the safety of the developed system, cytotoxicity studies were performed on HeLa cell lines (ATCC® CCL-2™).

Results. An original method of preparation of the drug carrier, based on iron zero-valent microparticles with covalently attached chitosan (Fe-CS) on their surface was proposed. Prepared microparticles demonstrated high encapsulation efficiency, drug loading capacity of DOX (0.9 mg per 1 mg of Fe-CS microparticles), low cytotoxicity and also a possibility to modulate the release rate by ultrasound irradiation and by changing pH of the external environment.

Conclusion. A carrier based on microparticles of zero-valent iron with covalently attached to the surface chitosan (Fe-CS) was obtained. The efficiency of encapsulation, the loading capacity of doxorubicin was determined and the possibility of its controlled release under the influence of an ultrasonic field at different pH values was confirmed. In an *in vitro* experiment on the HeLa cell line (ATCC® CCL-2™), no toxicity was established for all samples (Fe⁰, Fe-COOH и Fe-CS), regardless of their concentration.

Key words: doxorubicin, chitosan, zerovalent iron microparticles, drug delivery, stimuli responsive carrier, controlled release.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the TPU development project.

For citation: Di Martino A., Vlasov S.S., Guryev A.M., Yusubov M.S., Postnikov P.S., Belousov M.V. Development and properties of a new doxorubicin carrier based on surface-modified iron zero-valent microparticles with high encapsulation efficiency and the possibility of its controlled release. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 69–79. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-69-79>.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что химиотерапия является одним из основных [1] и наиболее эффективных методов лечения злокачественных новообразований, ее применение по-прежнему ограничивается серьезными побочными эффектами [2, 3]. Одной из причин возникновения побочных эффектов является отсутствие специфичности химиотерапевтических агентов к опухоли, в результате чего их курсовое введение приводит к токсическому воздействию на здоровые клетки организма [4]. Таким образом, помимо снижения качества жизни пациентов побочные эффекты химиотерапии остаются весьма серьезным препятствием для ее успешного клинического применения [5].

Одним из путей решения данной проблемы является использование систем доставки лекарственных средств (СДАС). Благодаря данным системам стало возможно значительное снижение числа побочных эффектов проводимой хи-

миотерапии, а также использование новых, более эффективных режимов лечения [6], поскольку СДАС обеспечивают легкое введение лекарственного средства, а также увеличение его накопления в опухоли [7–9]. В то же время основными недостатками большинства СДАС могут являться низкое содержание действующего вещества, невозможность удаленного инициирования его высвобождения, а также низкая эффективность инкапсуляции терапевтического агента.

Существует ряд работ, посвященных преодолению указанных недостатков. Так, например, инкапсуляция препарата может быть увеличена при использовании амфифильных полипептидов [10] или олигонуклеотидов [11], однако использование хитозана в качестве модификатора поверхности носителя может позволить увеличить загрузку химиотерапевтического агента за счет возможности образования большого числа водородных связей, а также за счет физических

взаимодействий [12] вследствие особенностей его полимерной структуры. В качестве модельного химиотерапевтического агента планируется использование доксорубина, связывание которого с поверхностью носителя происходит за счет возникающих электростатических взаимодействий. Поскольку в молекулах доксорубина и хитозана присутствуют положительно заряженные аминогруппы [13–16], то для электростатического связывания данных компонентов системы целесообразно использование отрицательно заряженного кросс-линкера, например натрия триполифосфата [17]. Преимуществами подобной СДАС являются более высокая эффективность инкапсуляции и, следовательно, повышение содержания терапевтического агента, а также возможность управления кинетикой его высвобождения за счет воздействия как внешних (ультразвуковое излучение), так и внутренних факторов (значения рН окружающей среды). Более того, частицы ноль-валентного железа являются перспективным носителем для разработки эффективной СДАС за счет их лучших магнитных свойств по сравнению с оксидами железа [18], а использование микронных размеров частиц позволяет решать задачи локальной эмболизации опухоли для терапевтических целей.

Таким образом, целью данной работы является синтез нового СДАС на основе поверхностно-модифицированных микрочастиц ноль-валентного железа, изучение его свойств в качестве носителя химиотерапевтического агента (эффективность инкапсуляции, емкость загрузки, возможность контролируемого высвобождения химиотерапевтического агента) и безопасности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований были использованы реагенты и органические растворители, являющиеся товарными продуктами фирм Aldrich (США), Fluka (Австрия) и др., соответствующей чистоты, которые использовались без предварительной очистки.

Определение размеров и дзета-потенциала микрочастиц проводили с использованием водной суспензии с концентрацией 1 мг/мл и рН = 7 на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Для определения размеров применяли метод динамического рассеяния света. Доказательство ковалентной прививки органических функциональных групп на микрочастицы железа (Fe-СООН) оценивали методом ИК-спектроскопии на приборе Nicolet iS5 Infrared Spectrometer (Thermo Scientific, США).

Методика синтеза 4-карбоксібензилдиазоний тозилата. Синтез осуществляли в соответствии с методикой [19].

Методика синтеза микрочастиц Fe-СООН и Fe-CS. Синтез микрочастиц железа проводили по модифицированному методу синтеза, разработанному ранее [20]. Хлорид железа (III) (0,406 г; 1,5 ммоль) и натрия боргидрид (0,171 г; 4,5 ммоль) растворяли в 10 мл дистиллированной воды. Далее в трехгорлой колбе в атмосфере аргона смешивали по 5 мл приготовленных растворов. Перемешивание осуществляли в течение 10 мин с использованием магнитной мешалки. Затем к полученной смеси добавляли оставшиеся 5 мл растворов хлорида железа (III) и натрия боргидрида и снова перемешивали в течение 10 мин. Далее к полученной реакционной массе приливали 20 мл водного раствора 4-карбоксібензолдиазоний тозилата (0,3 г) и продолжали перемешивание в течение еще 40 мин. Полученные микрочастицы Fe-СООН выделяли из смеси путем осаждения с помощью неодимового магнита и последовательно промывали водой, этанолом и ацетоном до достижения прозрачного раствора над частицами. После промывки микрочастицы высушивали лиофильно для удаления следов растворителей.

Для получения микрочастиц Fe-CS навеску микрочастиц Fe-СООН массой 75 мг, полученных на предыдущем этапе, суспендировали в 75 мл воды. К полученной суспензии добавляли 12,9 мг N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорида и 15,54 мг N-гидроксисукцинимиды. Смесь перемешивали в течение 2 ч. Параллельно растворяли 750 мг хитозана в 300 мл 1%-й (об/об) уксусной кислоты. Далее суспензию Fe-СООН приливали к раствору хитозана. Полученную смесь оставляли при интенсивном перемешивании на 48 ч.

Затем для выделения микрочастиц Fe-CS полученную смесь центрифугировали при 7 500 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отделяли, а полученный осадок повторно суспендировали в 50 мл дистиллированной воды и центрифугировали при тех же условиях. Процедуру отмывки повторяли 3 раза. Очищенные микрочастицы Fe-CS высушивали лиофильно.

Методика получения конъюгата Fe-CS/ДОКС. Навеску микрочастиц Fe-CS массой 20 мг суспендировали в 20 мл воды. Параллельно готовили по 20 мл растворов доксорубина (ДОКС) и натрия триполифосфата (ТПП) с концентрациями 1 мг/мл. Оба раствора смешивали и оставляли при перемешивании в течение 1 ч на магнитной мешалке.

Далее полученную смесь ДОКС/ТПП по каплям добавляли к суспензии микрочастиц Fe-CS. Смесь Fe-CS/ТПП/ДОКС оставляли при интенсивном перемешивании на 2 ч.

Полученную реакционную массу центрифугировали при 7 500 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отделяли, а осадок микрочастиц повторно суспендировали в дистиллированной воде и центрифугировали при тех же условиях, а затем высушивали лиофильно.

Изучение высвобождения доксорубицина и эффективности инкапсуляции. Изучение высвобождения проводили при постоянной температуре 37 °С и перемешивании 100 об/мин. Для проведения эксперимента использовали инкубатор Stuart SI 500 (Stuart, Великобритания). В качестве растворителя использовали смесь KCl/HCl с начальным значением pH = 3,3. Смесь готовили путем смешивания 50 мл 0,2 М раствора KCl со 140 мл дистиллированной воды. Далее добавляли 0,2 М раствор соляной кислоты до достижения pH = 3,3. Затем полученный раствор доводили до 400 мл дистиллированной водой. Изучение высвобождения проводили при трех различных значениях pH (3,3; 5,5; 7,4). Величину значений кислотности изменяли последовательно. Для проведения эксперимента готовили 10 мл суспензии конъюгата Fe-CS/ДОКС с концентрацией 1 мг/мл. Исследуемый образец помещали в инкубатор и через установленные промежутки времени отбирали пробы среды высвобождения в объеме 2 мл. Образец предварительно центрифугировали при 7 500 об/мин в течение 5 мин. Концентрацию высвободившегося доксорубицина в пробе определяли методом УФ-спектроскопии при длине волны 480 нм на спектрофотометре Evolution 201/220 UV-Visible Spectrophotometers (Thermo Scientific, США). Отобранный объем среды замещали эквивалентным объемом свежего раствора KCl/HCl. Изменение значений pH проводили путем добавления 0,1 М раствора натрия гидроксида до достижения необходимого значения.

Изучение высвобождения доксорубицина под воздействием ультразвука проводили параллельно при условиях, аналогичных описанным выше. Отличием данной методики является внесение исследуемого образца в ультразвуковое поле с частотой 75 кГц и удельной мощностью 2 Вт/см² на 30 с. В качестве источника ультразвукового излучения использовали ультразвуковую ванну Elmasonic S10H (Elma, Германия). Обработку ультразвуком осуществляли непосредственно перед центрифугированием образца. Концентрацию

высвободившегося доксорубицина в пробе также определяли методом УФ-спектроскопии при длине волны 480 нм.

Использование ультразвукового (УЗ) излучения низкой частоты необходимо для иницирования высвобождения доксорубицина без повреждения структуры тканей организма. Описанное значение частоты УЗ излучения было использовано для демонстрации чувствительности исследуемой системы к внешним иницирующим воздействиям.

Эффективность инкапсуляции (ЭИ) определяли в соответствии с методом [21]. Расчет ЭИ проводили по формуле

$$\text{ЭИ (\%)} = \left(\frac{D_T - D_\phi}{D_T} \right) \times 100,$$

где D_T – теоретическая концентрация взятого для загрузки доксорубицина, D_ϕ – концентрация ДОКС после процесса инкапсуляции.

Концентрацию доксорубицина в образцах определяли методом УФ-спектроскопии при длине волны 480 нм. Для расчета концентрации использовали калибровочную кривую, которую строили по результатам измерения поглощения падающего света растворами доксорубицина в диапазоне концентраций 3,75–60 мкг/мл [22].

Влияние pH и поверхностной модификации на изменение ЭИ оценивали по следующей методике. Раствор ДОКС (1 мг/мл, 1 мл) добавляли к суспензии ноль-валентного железа или Fe-SOON (1 мг/мл, 1 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 5 мин, затем центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 мин. Образовавшийся супернатант отбирали для анализа. Для микрочастиц Fe-CS определение ЭИ проводили в соответствии с описанной методикой, но с использованием смеси ДОКС/ТПП (2 мл, вместо раствора ДОКС). Смесь ДОКС/ТПП готовили в соответствии с разделом «Методика получения конъюгата Fe-CS/ДОКС» и к суспензии микрочастиц прибавляли по каплям.

Влияние концентрации ДОКС на ЭИ изучали при pH = 5,5 по следующей методике. Раствор ДОКС объемом 1 мл с исследуемой концентрацией (0,4; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0 мг/мл) добавляли к суспензии, содержащей ноль-валентное железо или Fe-SOON (1 мг/мл, 1 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 5 мин, затем центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 15 мин. Образовавшийся супернатант отбирали для анализа. Для микрочастиц Fe-CS определение проводили в соответствии с описанной методикой, но с использованием смеси ДОКС/ТПП вместо раствора ДОКС. Смесь ДОКС/ТПП готовили с использо-

ванием растворов доксорубина с концентрациями (0,6; 1,05; 1,5; 2,25; 3,0 мг/мл) в соответствии с разделом «Методика получения конъюгата Fe-CS/ДОКС» и к суспензии микрочастиц прибавляли по каплям.

Методика изучения цитотоксичности. Определение цитотоксичности проводили с использованием клеточной линии HeLa (ATCC® CCL-2™). Выживаемость клеток *in vitro* определяли методом МТТ в соответствии со следующим протоколом [23]. Клетки культивировали в отдельных средах ($2,5 \times 10^5$ клеток/мл), содержащих микрочастицы железа ноль-валентного (Fe^0), Fe-COOH и Fe-CS, соответственно, в течение 24, 48 и 72 ч. Среда, не содержащую микрочастиц, использовали в качестве контроля.

Суспензии анализируемых образцов микрочастиц с концентрацией 5–100 мкг/мл готовили непосредственно в среде. Удаление среды из каждой ячейки производили методом аспирации. Клетки в каждой ячейке промывали 200 мкл фосфатного буфера, а затем в каждую ячейку добавляли по 50 мкл раствора метилтиазолилтетразолия (МТТ) в концентрации 1 мг/мл. Спустя 2 ч инкубирования раствор МТТ удаляли путем аспирации и добавляли по 50 мкл изопропанола в каждую ячейку для растворения формазановых кристаллов. Оптическую плотность измеряли трижды для каждого образца при длине волны 595 нм с использованием многоканального считывателя (Тесап, Швейцария). Выживаемость клеток (%) рассчитывали как соотношение средних значений оптической плотности для каждого образца ($I_{\text{образец}}$) и контрольного образца ($I_{\text{контроль}}$).

$$\text{Выживаемость (\%)} = \frac{(I_{\text{образец}})}{(I_{\text{контроль}})} \times 100$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нами был проведен синтез микрочастиц железа, покрытых органическими функциональными группами. Для этого мы модифицировали ранее опубликованный метод [20], включающий в себя восстановление железа из соответствующего трихлорида борогидридом натрия в присутствии 4-карбоксибензолдиазоний тозилата. Для получения частиц микронных размеров мы использовали двухстадийное добавление трихлорида железа для роста частиц, и лишь потом добавляли раствор 4-карбоксибензолдиазоний тозилата для модификации. Размер полученных микрочастиц контролировали с использованием метода динамического светорассеивания (таблица).

Таблица

Размер и дзета-потенциал микрочастиц		
Название образца	Размер частиц, мкм	Дзета-потенциал, мВ
Fe^0	$4,19 \pm 0,12$	$-0,03 \pm 0,01$
Fe-COOH	$4,32 \pm 0,18$	$-18,92 \pm 0,81$
Fe-CS	$4,48 \pm 0,28$	$20,61 \pm 1,51$

Эксперименты по определению размеров микрочастиц железа (Fe^0 , Fe-COOH и Fe-CS) показали отсутствие значимой дисперсии результатов в ходе проводимых модификаций.

Отрицательное значение дзета-потенциала для микрочастиц Fe-COOH объясняется присутствием на их поверхности карбоксильных групп. После дальнейшей модификации хитозаном происходит резкий сдвиг дзета-потенциала в положительную сторону, что, с одной стороны, объясняется появлением положительно заряженных аминогрупп, а с другой – уменьшением числа свободных карбоксильных групп за счет их участия в образовании амидной связи.

Полученные данные косвенно подтверждают ковалентную модификацию поверхности 4-карбоксифенильными группами, а также вторичную прививку хитозана на поверхность. Данные факты также были подтверждены методом ИК-спектроскопии (рис. 1).

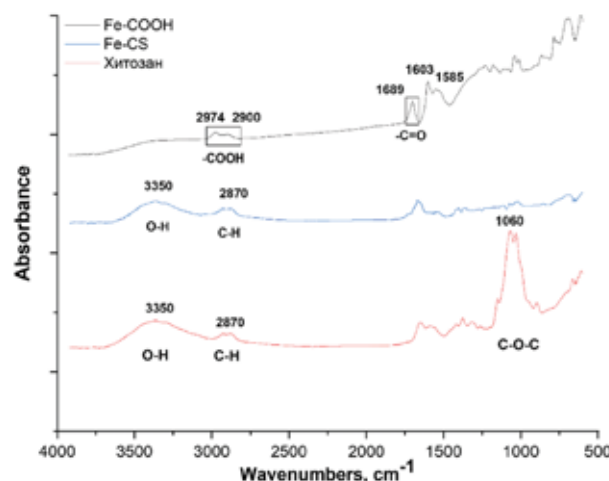


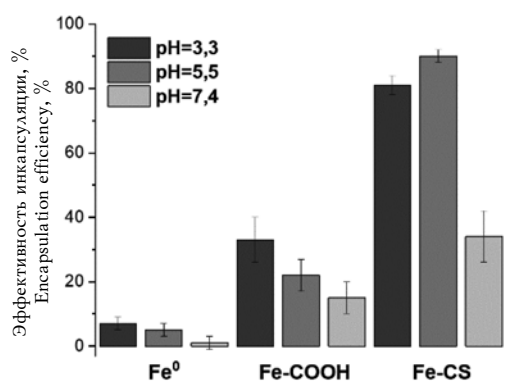
Рис. 1. ИК-спектры микрочастиц Fe-COOH, Fe-CS и чистого хитозана

Fig. 1. FTIR spectra of Fe-COOH, Fe-CS microparticles and pure chitosan

На спектре микрочастиц Fe-COOH наблюдались пики поглощения при длинах волн ν 2 974, 2 900 и $\nu_{C=O}$ 1 689 cm^{-1} , что указывает на присутствие карбоксильной группы (-COOH). По-

глощение при длинах волн ν_{C-C} 1 603 и 1 585 см^{-1} подтверждает присутствие бензольного кольца. Таким образом, полученные результаты могут указывать на прививку 4-карбоксифенильных групп к поверхности микрочастиц [24].

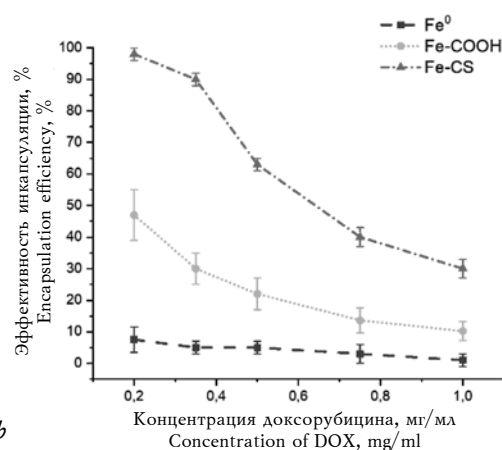
Спектры микрочастиц Fe-CS и хитозана сравнивали между собой. Спектр хитозана характеризуется наличием основных пиков поглощения



a

при длинах волн 3 350 см^{-1} , 2 870 см^{-1} (ν_{CH}) и 1 060 см^{-1} (ν_{C-O-C}). На спектре микрочастиц Fe-CS также присутствуют полосы поглощения при длинах волн 3 350 см^{-1} (ν_{OH}), 2 870 см^{-1} (ν_{CH}). В результате чего можно сделать вывод о наличии хитозана в структуре микрочастиц Fe-CS.

Изучение эффективности инкапсуляции и контролируемого высвобождения доксорубицина.



b

Рис. 2. Влияние pH и поверхностной модификации ДОКС (a) и концентрации ДОКС (b) на эффективность инкапсуляции

Fig. 2. Influence of pH and surface modification of DOX (a) and the concentration of DOX (b) on the encapsulation efficiency

Результаты, представленные на рис. 2, a, демонстрируют положительное влияние поверхностной модификации на ЭИ доксорубицина. Присутствие карбоксильных групп (-COOH) на поверхности микрочастиц значительно увеличивает эффективность инкапсуляции (более 25%) по сравнению с немодифицированными микрочастицами (Fe⁰). Более того, благодаря дальнейшей модификации поверхности (присоединение хитозана), эффективность инкапсуляции была увеличена до 90%, что делает систему Fe-CS подходящей для использования в качестве носителя лекарственных средств. Данное явление может быть объяснено следующим образом: молекулы доксорубицина из-за наличия положительно заряженных аминогрупп вступают в электростатические взаимодействия с карбоксильными группами микрочастиц Fe-COOH. Связывание компонентов усиливается благодаря появлению водородных связей [12].

В системе Fe-CS присоединение ДОКС также осуществлялось благодаря электростатическим взаимодействиям. За счет большого числа положительно заряженных аминогрупп в молекуле хитозана происходит увеличение емкости загрузки отрицательно заряженных молекул, что, в свою

очередь, приводит к увеличению ЭИ. Поскольку молекула ДОКС несет положительный заряд, ее присоединение к микрочастицам Fe-CS происходит с использованием отрицательного заряженного кросс-линкера (ТПП) в виде комплекса ДОКС-ТПП. Более того, повышение ЭИ может быть связано с увеличением числа водородных связей. Подтверждено влияние pH на ЭИ.

В эксперименте было показано последовательное уменьшение ЭИ при увеличении значений pH. Для микрочастиц Fe-COOH при увеличении pH с 3,3 на 5,5 ЭИ снижалась на 11%. При более сильном увеличении (с 3,3 на 7,4) ЭИ уменьшалась на 18% (см. рис. 2, a). Это объясняется за счет депротонирования функциональных групп (-NH⁺ и -COOH), что, в свою очередь, приводит к изменению их зарядов и ослаблению электростатических взаимодействий.

В системе Fe-CS также наблюдалось снижение ЭИ с увеличением значения pH за счет уменьшения прочности электростатических взаимодействий между функциональными группами ДОКС, хитозана и ТПП. В данном случае, благодаря присутствию гидрофильного покрытия (хитозана), происходит увеличение числа водородных связей, что повышает стабильность конъюгата.

На рис. 2, б, представлена оценка влияния концентрации доксорубина в реакционной смеси на эффективность инкапсуляции. В случае микрочастиц Fe⁰ наблюдалось стабильное уменьшение ЭИ после ее начального снижения. При концентрации ДОКС 0,5 мг/мл было достигнуто равновесие между процессами адсорбции-десорбции (ЭИ = 5%), о чем свидетельствует дальнейшее последовательное снижение ЭИ при увеличении концентрации ДОКС.

В случае микрочастиц Fe-COOH и Fe-CS наблюдалась похожая тенденция, но в отличие от Fe⁰ снижение наблюдалось на всем диапазоне исследуемых концентраций. В результате полученные данные подтверждают влияние поверхностной модификации на эффективность инкапсуляции. Также в ходе проведения эксперимента было установлено значение емкости загрузки, которое составило 0,9 мг доксорубина на 1 мг микрочастиц Fe-CS.

Оценку возможности контролируемого высвобождения доксорубина из системы Fe-CS про-

водили в эксперименте *in vitro* под воздействием УЗ-излучения при последовательном изменении значений pH.

Полученные в ходе эксперимента результаты (рис. 3) подтверждают влияние УЗ-излучения на скорость высвобождения терапевтического агента вне зависимости от pH среды. Такое влияние объясняется появлением кавитационных пузырьков в среде высвобождения при воздействии на нее ультразвука. Их дальнейшее разрушение приводит к появлению градиента сдвига, который, в свою очередь, вызывает растяжение и разрыв химических связей [25]. Присоединение компонентов системы, в том числе и терапевтического агента, происходит за счет электростатических взаимодействий, которые являются менее прочными, чем химические связи. В результате постепенное растяжение приводит к их разрушению и ускоренному высвобождению доксорубина. Таким образом, для исследуемой системы была подтверждена возможность контролируемого высвобождения доксорубина.

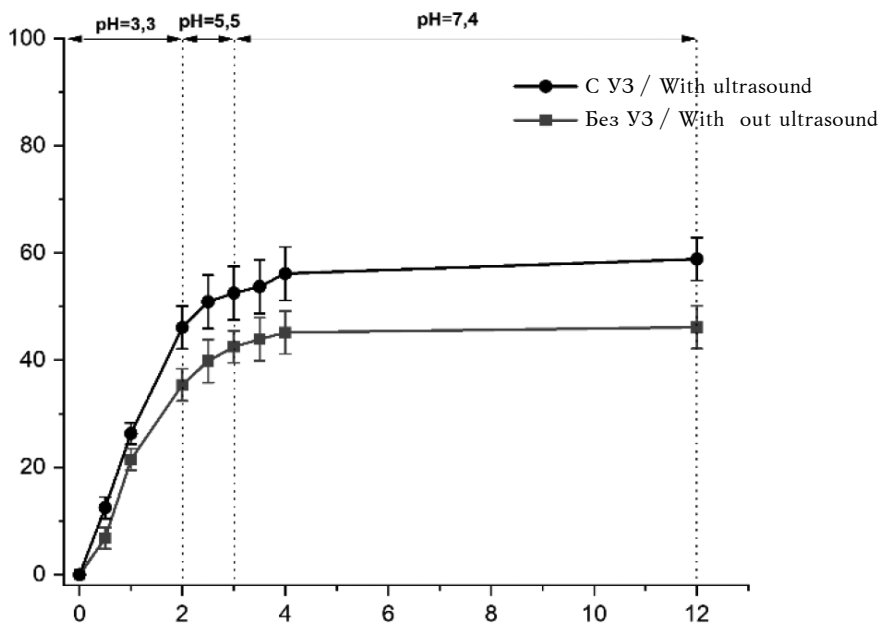


Рис. 3. Высвобождение доксорубина из конъюгата Fe-CS/DOX: по оси OX – время, ч; по оси OY – количество, %

Fig. 3. Release of doxorubicin from conjugate Fe-CS / DOX along the OX axis – time, h; OY axis – quantity, %

Исследование цитотоксичности. Результаты изучения цитотоксичности микрочастиц представлены на рис. 4.

Из диаграммы видно, что значения выживаемости клеток в присутствии различных концентраций исследуемых микрочастиц не отличаются

от значений, наблюдаемых в контроле (значения с концентрацией микрочастиц 0 мкг/мл), что свидетельствует об отсутствии самостоятельных цитотоксических свойств разрабатываемой СДАС (при отсутствии нагруженного химиотерапевтического агента).

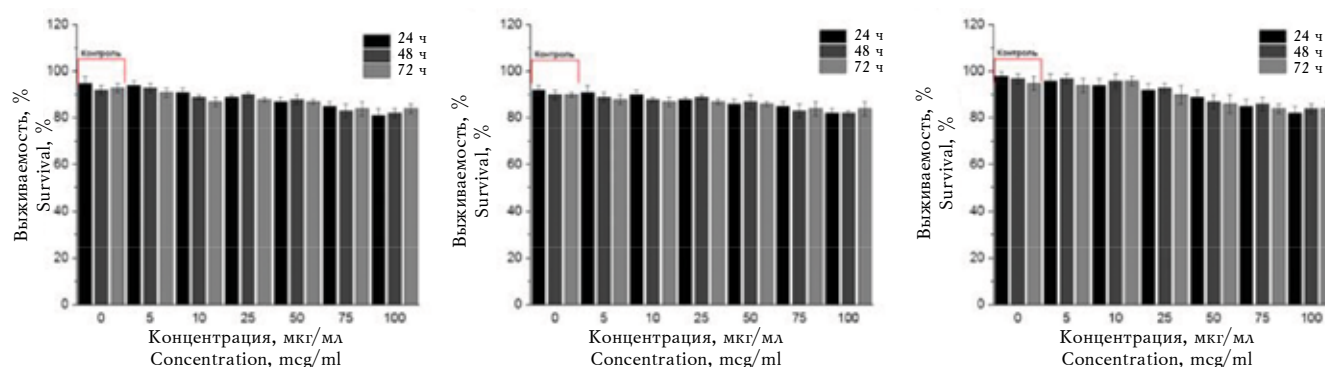


Рис. 4. Выживаемость клеточной линии HeLa в присутствии микрочастиц Fe⁰ (a), Fe-COOH (b) и Fe-CS (c) в зависимости от их концентрации и времени культивирования клеток

Fig. 4. HeLa cell line viability in presence of Fe⁰ (a), Fe-COOH (b) and Fe-CS (c) microparticles depending on their concentration and the time of cell cultivation

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований был разработан способ получения СДАС (Fe-CS/ДОКС) на основе микрочастиц ноль-валентного железа с ковалентно присоединенным к поверхности хитозаном. Изучена эффективность инкапсуляции химиотерапевтического агента (доксорубина) и определена емкость его загрузки (0,9 мг на 1 мг микрочастиц Fe-CS). Установлены значения контролируемого высвобождения доксорубина из конъюгата Fe-CS/ДОКС за 12 ч под воздействием ультразвукового излучения при различных значениях pH в эксперименте *in vitro* (58,8% под воздействием ультразвукового поля и 46,1 без его воздействия). Отсутствие цитотоксичности полученных микрочастиц было подтверждено в эксперименте *in vitro* на клеточной линии HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]) для всех образцов (Fe⁰, Fe-COOH и Fe-CS) вне зависимости от их концентрации.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Liu F.S. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy – A quick review. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 2009; 48 (3): 239–244. DOI: 10.1016/S1028-4559(09)60296-5.
- Wang D., Zhou J., Shi R., Wu H., Chen R., Duan B., Xia G., Xu P., Wang H., Zhou S., Wang C., Wang H., Guo Z., Chen Q. Biodegradable core-shell dual-metal-organic-frameworks nanotheranostic agent for multiple imaging guided combination cancer therapy. *Theranostics.* 2017; 7 (18): 4605–4617. DOI: 10.7150/thno.20363.
- Jain R.K., Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010; 7 (11): 653–664. DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.139.
- Palumbo M.O., Kavan P., Miller W.H. Jr., Panasci L., Assouline S., Johnson N., Cohen V., Patenaude F., Pollak M., Jagoe R.T., Batist G. Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead. *Front. Pharmacol.* 2013; 4 (57): 1–9. DOI: 10.3389/fphar.2013.00057.
- Sak. K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. *Chemotherapy Research and Practice.* 2012; 2012: 282570. DOI: 10.1155/2012/282570.
- Prasanna N.R., Triveni C., Soumya R., Ramana B.V., Nagarajan G. Novel Delivery Systems in Cancer Chemotherapy. *Research & Reviews in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2013; 2 (1): 8–19.
- Hu Q., Sun W., Wang C., Gu Z. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016; 98: 19–34. DOI: 10.1016/j.addr.2015.10.022.
- Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2007; 2 (12): 751–760. DOI: 10.1038/nnano.2007.387.
- Farokhzad O.C., Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano.* 2009; 3 (1): 16–20. DOI: 10.1021/nn900002m.
- Lv S., Li M., Tang Z., Song W., Sun H., Liu H., Chen X. Doxorubicin-loaded amphiphilic polypeptide-based nanoparticles as an efficient drug delivery system for cancer therapy. *Acta Biomater.* 2013; 9 (12): 9330–9342. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.015.
- Lee C.S., Kim H., Yu J., Yu S.H., Ban S., Oh S., Jeong D., Im J., Baek M.J., Kim T.H. Doxorubicin-loaded oligonucleotide conjugated gold nanoparticles: a promising in vivo drug delivery system for colorectal cancer therapy. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 142: 416–423. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.08.063.
- 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. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.061.
- Kiraly R., Martin R.B. Metal ion binding to daunorubicin and quinizarin. *Inorg. Chim. Acta.* 1982; 67: 13–18.

14. Gallois L., Fiallo M., Garnier-Suillerot A. Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles circular dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1998; 1370 (1): 31–40.
15. Pavinatto F.J., Caseli L., Oliveira O.N. Jr. Chitosan in nanostructured thin films. *Biomacromolecules.* 2010; 11 (8): 1897–1908. DOI: 10.1021/bm1004838.
16. Croisier F., Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur. Polymer J.* 2013; 49 (4): 780–792.
17. Yang W., Fu J., Wang T., He N. Chitosan/Sodium triphosphate nanoparticles: preparation, characterization and application as drug carrier. *J. Biomed Nanotechnol.* 2009; 5 (5): 591–595.
18. Xu Y., Zhang X.Y., Hsing Y.M., Fang Y.Z. Ultrasonic-assisted synthesis of Fe nanoparticles in the presence of Poly (N-vinyl-2-pyrrolidone). *Chinese J. Chem.* 2011; 29: 1829–1836.
19. 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 (18): 3961–3964. DOI: 10.1021/ol8013528.
20. Guselnikova 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. DOI: 10.3762/bjnano.6.121.
21. Fang C., Kievit F.M., Veiseh O., Stephen Z.R., Wang T., Lee D., Ellenbogen R.G., Zhang M. Fabrication of magnetic nanoparticles with controllable drug loading and release through a simple assembly approach. *J. Control Release.* 2012; 162 (1): 233–241. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.028.
22. Soares P.I.P., Sousa A.I., Ferreira I.M.M., Novo C.M.M., Borges J.P. Towards the development of multifunctional chitosan-based iron oxide nanoparticles: Optimization and modelling of doxorubicin release. *Carbohydr. Polym.* 2016; 153 (20): 212–221. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.07.109.
23. Prodan A.M., Iconaru S.L., Ciobanu C.S., Chifiriuc M.C., Stoicea M., Predoi D. Iron oxide magnetic nanoparticles: characterization and toxicity evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays. *Journal of Nanomaterials.* 2013; 2013: 10. DOI: 10.1155/2013/587021.
24. Chehimi M.M., Lamouri A., Picot M., Pinson J. Surface modification of polymers by reduction of diazonium salts. The example of polymethylmethacrylate. *J. Mater. Chem. C.* 2014; 2: 356–363. DOI: 10.1039/C3TC31492H.
25. Paulusse J.M.J., Sijbesma R.P. Ultrasound in polymer chemistry: Revival of an established technique. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.* 2006; 44 (19): 5445–5453. DOI: 10.1002/pola.21646.

Вклад авторов

Ди Мартино А., Власов С.С. – проведение практической части исследования, разработка концепции, дизайна, анализ и интерпретация данных. Гурьев А.М., Юсубов М.С., Постников П.С., Белоусов М.В. – разработка концепции, дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Authors contribution

Di Martino A., Vlasov S.S. – carrying out the practical part of the research, development of the concept, design, analysis and interpretation of data. Gurev A.M., Yusubov M.S., Postnikov P.S., Belousov M.V. – development of the concept, design, verification of critical intellectual content, final approval for publication of the manuscript.

Сведения об авторах

Ди Мартино Антонио, PhD, науч. сотрудник, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск; мл. науч. сотрудник, центр полимерных систем, Университет Томаша Бати, г. Злин, Чешская Республика.

Власов Сергей Сергеевич, аспирант, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск; технолог, Центр внедрения технологий, ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Гурьев Артем Михайлович, д-р фарм. наук, руководитель Центра внедрения технологий, ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Authors information

Di Martino Antonio, PhD, Researcher, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, NR TPU, Tomsk, Russian Federation; Senior Researcher, Centre of Polymer Systems, Tomas Bata University, Zlin, Czech Republic.

Vlasov Sergei S., PhD Student, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, NR TPU, Tomsk, Russian Federation; Production Engineer, Technology Implementation Centre of Central Scientific Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Guryev Artem M., DPharmSc, Head of Technology Implementation Centre of Central Scientific Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Юсубов Мехман Сулейманович, д-р хим. наук, профессор, директор Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск; гл. науч. сотрудник ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Постников Павел Сергеевич, канд. хим. наук, доцент, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск

Белоусов Михаил Валерьевич, д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ; НИ ТПУ, г. Томск.

(✉) **Власов Сергей Сергеевич**, e-mail: unreal800@gmail.com.

Yusubov Mekhman S., DChSc, Full Professor, Headmaster of Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, NR TPU, Tomsk, Russian Federation; Chief Researcher, Central Scientific Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Postnikov Pavel S., PhD, Associate Professor, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, NR TPU, Tomsk, Russian Federation;

Belousov Mikhail V., DPharmSc., Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis, SSMU; NR TPU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Vlasov Sergei S.**, e-mail: unreal800@gmail.com.

Поступила в редакцию 03.05.2018

Подписана в печать 14.12.2018

Received 03.05.2018

Accepted 14.12.2018