

ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ ГИДРАТИРУЕМОГО РАСТВОРА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛЕЦИТИНОВЫХ ЛИПОСОМ

Швецов Иван Сергеевич

Аспирант, Волгоградский государственный
медицинский университет, г. Волгоград
i.shvec95@mail.ru

EFFECT OF THE pH OF THE HYDRATED SOLUTION MEDIUM ON THE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LECITHIN LIPOSOMES

I. Shvetsov

Summary. The study is devoted to the study of the influence of the pH of the hydrated solution on the morphological characteristics of lecithin liposomes, namely: the stages of aggregation, the average size and distribution of the analyzed vesicles. For this purpose, solutions of sodium carbonate and magnesium chloride in concentrations of 5, 25, 50 and 100 mM were used as hydrated solutions for the production of liposomes by phase reversal. The concentration of lecithin in the analyzed dispersion medium was 50 mg / ml. The obtained lecithin liposomes were visualized by optical microscopy with a calibrated micrometer grid. As a result of the study, the optimal pH range of the hydrated solution was established — 5.87–6.93, which should be achieved when encapsulating hydrophilic drugs in lecithin liposomes.

Keywords: liposomes, vesicles, lecithin, hydrated solution, hydrogen index, liposome morphology.

Аннотация. Исследование посвящено изучению влияния pH среды гидратируемого раствора на морфологические характеристики лецитиновых липосом, а именно: стадии агрегации, средний размер и характер распределения анализируемых везикул. Для этого использовались растворы натрия карбоната и магния хлорида в концентрациях 5, 25, 50 и 100 мМ в качестве гидратируемых растворов для получения липосом методом обращения фаз. Концентрация лецитина в анализируемой дисперсионной среде составляла 50 мг/мл. Полученные лецитиновые липосомы визуализировались методом оптической микроскопии с откалиброванной микрометрической сеткой. В результате исследования установлен оптимальный диапазон pH гидратируемого раствора — 5,87–6,93, который должен быть достигнут при инкапсуляции гидрофильных лекарственных средств в лецитиновые липосомы.

Ключевые слова: липосомы, везикулы, лецитин, гидратируемый раствор, водородный показатель, морфология липосом.

Введение

Способности регулирования фармакокинетических параметров (всасывание, распределение, биотрансформация и выведение) лекарственных средств (ЛС), обеспечение нацеленного действия на органы и мишени и минимизация нежелательных реакций и побочных эффектов ЛС [11] — являются приоритетными направлениями персонализированной медицины и фармации. Один из способов реализации вышеуказанных направлений достигается разработкой транспортных терапевтических систем (ТТС) для направленной доставки ЛС [9], представленные лекарственными формами с пролонгированным действием, в которых ЛС диспергировано в матрице биополимера или инкапсулировано в защитную оболочку.

Самая популярная и широко применяемая на сегодняшний день ТТС является система доставки с использованием липосом (ЛПС) [10]. Данный факт подтверждается

использованием ЛПС в качестве ТТС для лечения онкологических (Doxil[®], Depocyt[®]) и грибковых заболеваний (Ambisome[®], Amphotec[®]). Также разработаны анальгетические липосомальные препараты: DepoDur[®] — липосомальный морфина сульфат, Exparel[®] — липосомальный бупивакаин [4, 7].

ЛПС представляют собой везикулы, состоящие из фосфолипидного бислоя, который образует внутренний изолированный водный объем. Фосфолипидная природа ЛПС определяет их нетоксичность, биосовместимость и биоразлагаемость, а также способность инкапсулировать ЛС в зависимости от физико-химических свойств [5]. Так, гидрофильные ЛС инкапсулируются во внутренний объем, а липофильные ЛС заключаются в фосфолипидный бислой ЛПС [10]. В зависимости от применяемых технологий, методов и условий, могут быть получены ЛПС размерами от 10–1000 нм и более. При этом химические свойства используемых фосфолипидов определяют положительный или отрицательный

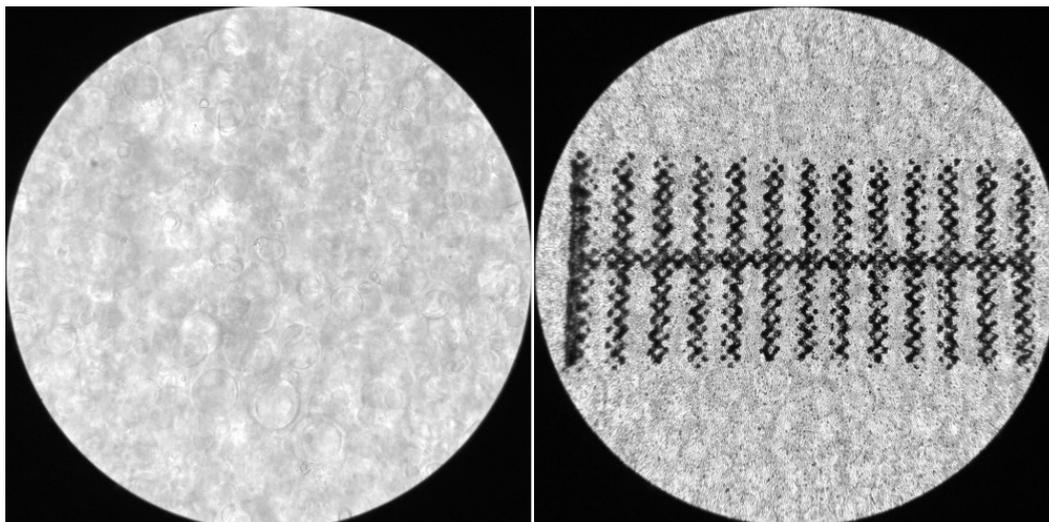


Рис. 1. Визуализация лецитиновых ЛПС, дисперсионная среда — вода очищенная

заряд на поверхности мембраны [4]. Применяемые методы функциональной модификации повышения эффективности применения ЛПС позволили получить длительно циркулирующие ЛПС, специфически нацеленные ЛПС, рН-чувствительные и светоиницируемые ЛПС [3].

Традиционным методом получения ЛПС является метод обращения фаз (метод гидратации липидной пленки), который включает следующие стадии: растворение фосфолипидов в органическом растворителе, выпаривание растворителя и получение липидной пленки, гидратация пленки с образованием гетерогенных ЛПС, и последующая гомогенизация с помощью экструзии или ультразвука до требуемых значений. В таком случае процесс образования ЛПС обусловлен энтропийно-обусловленной самосборкой фосфолипидов в везикулярные структуры в результате гидратации дисперсионной средой [6, 8].

Актуальность применения ЛПС в ТТС подтверждена современными исследованиями, которые направлены на разработку оптимальных фосфолипидных составов, условий и методов получения, способов достижения адресной доставки, а также изучение стабильности ЛПС [3, 4, 5]. Особое внимание исследователей направлено на изучение условий агрегации ЛПС, при которых ЛПС изменяют свою форму и образуют агрегаты с измененными физико-химическими характеристиками [2, 7].

Таким образом, цель данного исследования — определить влияние рН среды гидратируемого раствора на морфологические характеристики лецитиновых ЛПС.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи: 1) методом обращения фаз получить ле-

цитиновые ЛПС с дисперсионными средами различной рН среды; 2) визуализировать полученные ЛПС методом оптической микроскопии и определить морфологические характеристики.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись ЛПС в разных дисперсионных средах, полученные методом обращения фаз [8]. В качестве источника фосфолипидов использовался подсолнечный лецитин (ООО «Ювикс-фарм», Россия, ТУ 9197-002-57531875-2015), который растворялся в достаточном количестве хлороформа, химически чистом (ООО «Компонент-Реактив», Россия, ТУ СОМР 2-028-06). Липидная пленка получалась выпариванием органического растворителя на ротационном испарителе R-213b, «SENCO Technology Co., Ltd.» (Китай). В качестве гидратируемых растворов использовалась вода очищенная, водные растворы магния хлорида и натрия карбоната в концентрациях 5, 25, 50, 100 мМ. Гидратация проводилась ручным встряхиванием до полного растворения пленки в дисперсионной среде. Полученная смесь пропусклась через воронку фильтровальную (ГОСТ 25336-82) с размерами пор 100 мкм. Концентрация фосфолипидов составляла 50 мг/мл.

Среда рН гидратируемых растворов фиксировалась потенциометрическим методом на рН-метре рН-150МИ, ООО «Измерительная техника» (Россия).

Везикулы визуализировались методом оптической микроскопии [1] с помощью светового микроскопа Биолам 70, «Bresser Optics» (Германия), с откалиброванной микрометрической сеткой, цена деления которой составляла 19 мкм при изучаемом увеличении в 40^x.

Таблица 1. Характеристика гидратируемых растворов натрия карбоната и морфологические данные полученных везикул

Концентрация гидратируемого раствора натрия карбоната, мМ	pH среды гидратируемого раствора	Стадия агрегации везикул	Средний размер везикул / агрегатов, мкм	Процент наблюдаемых везикул / агрегатов, от исследуемой области окуляра, %
5	6,93	Отсутствует	$26 \pm 1,2$	$76 \pm 2,5$
25	7,54	Слабовыраженная	$35 \pm 1,5$	$59 \pm 2,7$
50	8,75	Сильно выраженная	$47 \pm 2,1$	$48 \pm 2,2$
100	9,68	Сильно выраженная	$56 \pm 2,6$	$45 \pm 1,9$

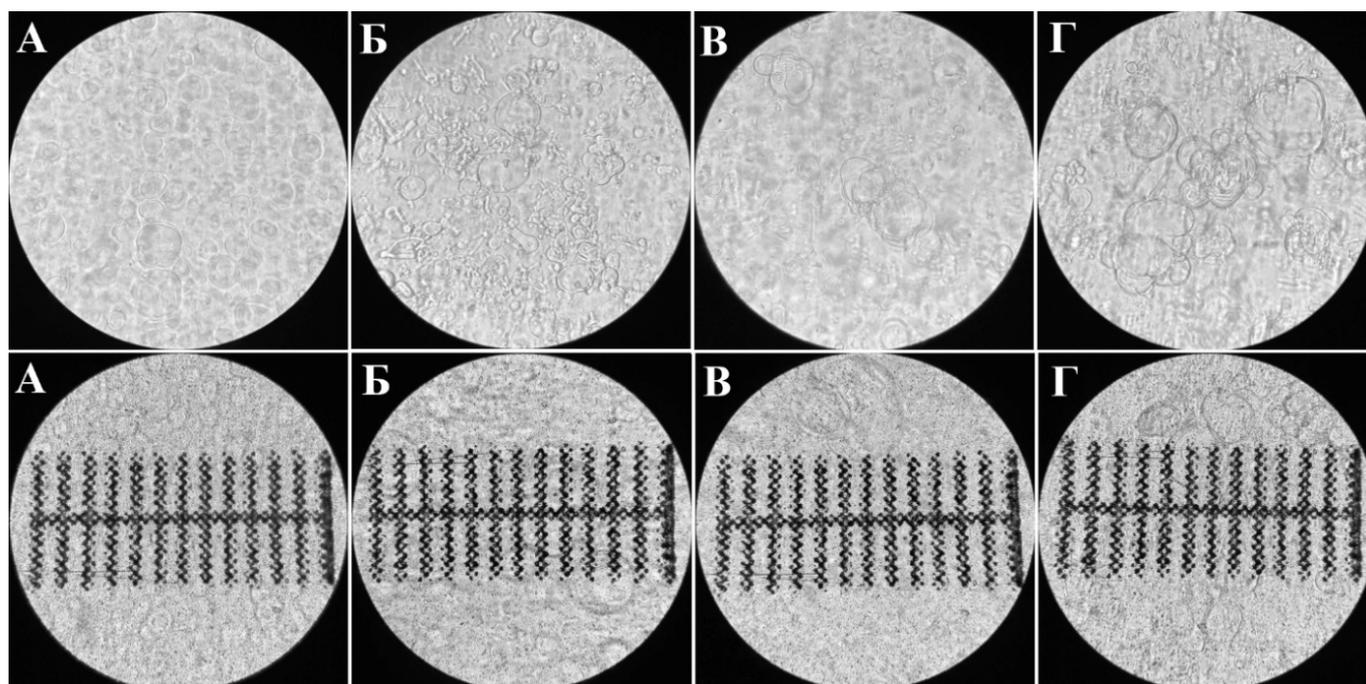


Рис. 2. Визуализация лецитиновых ЛПС, дисперсионная среда — раствор натрия карбоната в концентрациях: А — 5 мМ, Б — 25 мМ, В — 50 мМ, Г — 100 мМ

Результаты исследования

На первом этапе исследования были получены ЛПС, где в качестве гидратируемого раствора использовалась вода очищенная, pH 6,54. Визуализация водного раствора ЛПС (рис. 1) показала следующие морфологические характеристики: отсутствие агрегации, сферическая форма везикул, средний размер — $25 \pm 1,1$ мкм, равномерное распределение в исследуемой области окуляра, процент наблюдаемых везикул от исследуемой области окуляра — $80 \pm 3\%$.

На втором этапе, растворы натрия карбоната в концентрациях 5, 25, 50 и 100 мМ использовались в качестве дисперсионной среды для получения ЛПС. В результате визуализации ЛПС подтверждено наличие агрегации

различного характера с образованием агрегатов (рис. 2), имеющие различные морфологические показатели (табл. 1).

Повышение концентрации свободных гидроксид-ионов (OH^-) в гидратируемом растворе повлияло на морфологические характеристики готовых ЛПС. Так, при смещении pH среды в слабощелочную сторону — 7,54, наблюдалась слабовыраженная стадия агрегации ЛПС, которая характеризовалась изменением формы везикул и концентрированием их отдельными группами. Дальнейшее повышение pH среды дисперсионной среды до 8,75 и 9,68, приводило к сильно выраженной агрегации ЛПС, проявляющейся слипанием и объединением везикул в крупные агрегаты. Таким образом, при увеличении pH среды гидратируемого раствора наблюдались

Таблица 2. Характеристика гидратируемых растворов магния хлорида и морфологические данные полученных везикул

Концентрация гидратируемого раствора магния хлорида, мМ	рН среды гидратируемого раствора	Стадия агрегации везикул	Средний размер везикул / агрегатов, мкм	Процент наблюдаемых везикул / агрегатов от исследуемой области окуляра, %
5	5,87	Отсутствует	$25 \pm 1,1$	$79 \pm 3,8$
25	5,11	Начальная	$19 \pm 0,8$	$54 \pm 2,6$
50	4,49	Слабовыраженная	$17 \pm 0,75$	$41 \pm 1,9$
100	3,97	Слабовыраженная	$16 \pm 0,6$	$33 \pm 1,5$

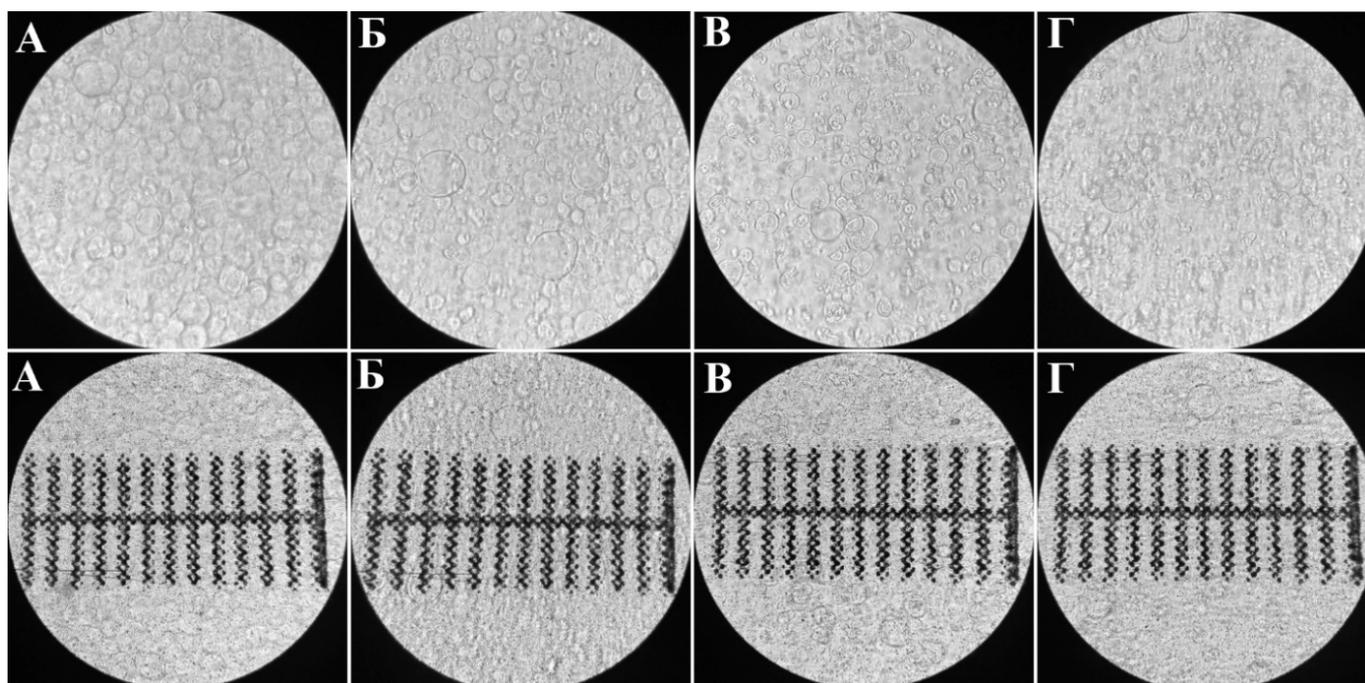


Рис. 3. Визуализация лецитиновых ЛПС, дисперсионная среда — раствор магния хлорида в концентрациях: А — 5 мМ, Б — 25 мМ, В — 50 мМ, Г — 100 мМ

следующие тенденции: увеличение среднего размера везикул и их агрегатов с $26 \pm 1,2$ мкм до $56 \pm 2,6$ мкм, и уменьшение процента наблюдаемых везикул и их агрегатов с $76 \pm 2,5\%$ до $45 \pm 1,9\%$.

На заключительном этапе исследования были получены и проанализированы ЛПС с гидратируемыми растворами магния хлорида в концентрациях 5, 25, 50, 100 мМ. Визуализация ЛПС (рис. 3) подтвердила наличие начальной и слабовыраженной агрегации везикул при концентрации магния хлорида 50 и 100 мМ, однако морфологические данные имели расхождения при различных концентрациях солевого раствора (табл. 2).

Уменьшение рН дисперсионной среды, обусловленное увеличением свободных ионов водорода (H^+), также

оказало влияние на морфологические характеристики ЛПС. Начальная и слабовыраженная стадия агрегации наблюдалась при рН 5,11, 4,49 и 3,97. Однако, с увеличением концентрации магния хлорида, наблюдаемый процент от исследуемой области окуляра и средний размер везикул и их агрегатов уменьшался от $25 \pm 1,1$ мкм и $79 \pm 3,8\%$, до $16 \pm 0,6$ и $33 \pm 1,5\%$ соответственно.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования определено влияние рН среды гидратируемого раствора, на примере водных солевых растворов, на следующие морфологические характеристики лецитиновых ЛПС — стадия агрегации, средний размер и наблюдаемый процент в исследуемой области везикул и их агрегатов.

Оптимальные значения pH дисперсионной среды находится в промежутке от 5,87 до 6,93. При этом, морфологические характеристики полученных ЛПС соответствуют характеристикам везикул в среде воды очищенной.

При изменении среды pH в более щелочную или кислую, наблюдается агрегация везикул с изменением их среднего размера и нарушается их распределение в дисперсионной среде. Данные факторы могут негатив-

но оказывать влияние на качество и стабильность полученных ЛПС, в том числе, быть причиной низкой эффективности инкапсуляции ЛС в ЛПС.

Таким образом, при получении ЛПС методом обращения фаз, оптимальным условием является значение pH гидратируемого раствора от 5,87 до 6,93. Отсюда возникает необходимость в стабилизации pH водных растворов ЛС, которые не входят в данный диапазон, для возможности их инкапсуляции в лецитиновые ЛПС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology / A.L. Robson, P.C. Dastoor, J. Flynn [et al.] // *Front Pharmacol.* — 2018. — Vol. 9. DOI: 10.3389/fphar.2018.00080
2. Aggregation of polyethylene glycol polymers suppresses receptor-mediated endocytosis of PEGylated liposomes / Z. Shen, H. Ye, M. Kröger, Y. Li // *Nanoscale.* — 2018. — № 10 (9). — P. 4545–4560. DOI: 10.1039/c7nr09011k
3. Composition design and medical application of liposomes / M. Li, C. Du, N. Guo [et al.] // *Eur J Med Chem.* — 2019. — № 164. — P. 640–653. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.007
4. Drug nanocrystallisation within liposomes / T. Li, D. Cipolla, T. Rades, B.J. Boyd // *J Control Release.* — 2018. — № 288. — P. 96–110. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.09.001
5. Liposomes for drug delivery in stroke / G.E. Bruch, L.F. Fernandes, B.L.T. Bassi [et al.] // *Brain Res Bull.* — 2019. — № 152. — P. 246–256.
6. Rideau E. Self-assembly of giant unilamellar vesicles by film hydration methodologies / E. Rideau, F.R. Wurm, K. Landfester // *Adv Biosyst.* — 2019. — № 3 (6). — DOI: 10.1002/adbi.201800324
7. Study on the in situ aggregation of liposomes with negatively charged phospholipids for use as injectable depot formulation / L. Rahnfeld, J. Thamm, F. Steiniger [et al.] // *Colloids Surf B Biointerfaces.* — 2018. — № 168. — P. 10–17. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.02.023
8. Zhang H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation / H. Zhang // *Methods Mol Biol.* — 2017. — № 1522. — P. 17–22. DOI: 10.1007/978-1-4939-6591-5_2
9. Наноразмерные лекарственные средства: особенности оценки безопасности / Е.М. Бовина, Б.К. Романов, А.С. Казаков [и др.] // *Безопасность и риск фармакотерапии.* — 2019. — Т. 7, № 3. — С. 127–138.
10. Попова Е.А. Современные тенденции в разработке и производстве наноразмерных систем для доставки лекарственных соединений / Е.А. Попова, П.П. Бельтюков, А.С. Радилов // *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики.* — 2020. — Т. 2, № 2. — С. 206–222.
11. Разработка липосомальных форм лекарственных препаратов: методы оценки и показатели качества / Е.В. Мельникова, Д.В. Горячев, А.А. Чапленко [и др.] // *Вестник Российского государственного медицинского университета.* — 2018. — № 6. — С. 35–42.

© Швецов Иван Сергеевич (i.shvec95@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»