



УДК: 615.071: 615.465.1: 616-006.04.
DOI: 10.14739/2409-2932.2017.1.93448

О. В. Стадніченко¹, Ю. М. Краснопольський², Т. Г. Ярних¹

Вплив концентрації ліпідів на ступінь інкапсуляції та розмір часток при розробці ліпосомальної форми іринотекану

¹Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна,
²Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Україна

Мета роботи – дослідження впливу концентрації ліпідів на розмір часток і ступінь інкапсуляції при створенні ліпосом з іринотеканом.

Матеріали та методи. У роботі використовували створення ліпосом методом «хімічного градієнта» у різновиді «градієнта рН» із внутрішнім буфером на основі цитрату амонію із рН 2,5. Отримана ліпідна плівка з дальшою гомогенізацією емульсії методом високого тиску на гомогенізаторі Microfluidics Microfluidizer M-110P. Градієнт створювали методом ультрафільтрації на установці «Minim 2» фірми PALL. Використовували ультрафільтраційні касети із верхньою межею відсікання 30 кДа. Вимірювали ступінь інкапсуляції за допомогою розробленої ВЕРХ методики у варіанті гель-хроматографії на приладі Shimadzu LC-20. Розмір часток вимірювали методом лазерної дифракції на приладі Malvern Instruments «Zetasizer Nano ZS».

Результати. Для приготування ліпосом використовували постійне співвідношення при варіації загальної концентрації ліпідів. Співвідношення ліпідів під час експерименту становило: фосфатидилхолін/холестерин 80/20 % масових. Досліджені загальні концентрації від 10 мг/мл до 30 мг/мл. Кількість циклів екструзії становила від 3 циклів при 1500 атм для концентрації 10 мг/мл, до 17 циклів при 1500 атм для концентрації 30 мг/мл. При цьому показано, що при концентрації ліпідів, починаючи з 25 мг/мл, в емульсії наявні частки більше ніж 5000 нм, від яких неможливо позбавитися методом гомогенізації.

Висновки. Доведено, що найоптимальнішою з точки зору технології та кінцевих характеристик ліпосом є концентрація ліпідів 20 мг/мл. Ступінь інкапсуляції при цьому становив $82 \pm 0,98$ %, розмір ліпосом – 106 нм, частки більше ніж 5000 нм відсутні.

Ключові слова: ліпосоми, іринотекан, ліпідний бішар, фосфатидилхолін, холестерин, гомогенізація методом високого тиску.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2017. – Т. 10, № 1(23). – С. 37–41

Влияние концентрации липидов на инкапсуляцию и размер частиц при разработке липосомальной формы иринотекана

А. В. Стадниченко, Ю. М. Краснопольский, Т. Г. Ярных

Цель работы – исследование влияния концентрации липидов на размер частиц и степень инкапсуляции при создании липосом с иринотеканом.

Материалы и методы. В работе использовали получение липосом методом «химического градиента» в разновидности «градієнта рН» с внутренним буфером на основе цитрата аммония с рН 2,5. Получена липидная плёнка с дальнейшей гомогенизацией эмульсии методом высокого давления на гомогенизаторе Microfluidics Microfluidizer M-110P. Градиент создавали методом ультрафильтрации на установке «Minim 2» фирмы PALL. Использовали ультрафильтрационные кассеты с верхним пределом отсечения 30 кДа. Измеряли степень инкапсуляции с помощью разработанной ВЭЖХ методики в варианте гель-хроматографии на приборе Shimadzu LC-20. Размер частиц измеряли методом лазерной дифракции на приборе Malvern Instruments «Zetasizer Nano ZS».

Результаты. Для приготовления липосом использовали постоянное соотношение при варьировании общей концентрации липидов. Соотношение липидов во время эксперимента составило фосфатидилхолин/холестерин 80/20 % массовых. Были исследованы общие концентрации от 10 мг/мл до 30 мг/мл. Количество циклов экструзии составило от 3 циклов при 1500 атм для концентрации 10 мг/мл до 17 циклов при 1500 атм для концентрации 30 мг/мл. При этом показано, что при концентрации липидов, начиная с 25 мг/мл, в эмульсии имеются частицы более 5000 нм, от которых невозможно избавиться методом гомогенизации.

Выводы. Доказано, что оптимальной с точки зрения технологии и конечных характеристик липосом является концентрация липидов 20 мг/мл. Степень инкапсуляции составила $82 \pm 0,98$ %. Размер липосом при этом составил 106 нм, частицы более 5000 нм отсутствовали.

Ключевые слова: липосомы, иринотекан, липидный бислой, фосфатидилхолин, холестерин, гомогенизация методом высокого давления.

Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2017. – Т. 10, № 1(23). – С. 37–41

Influence of lipid concentration on encapsulation and particle size in the development of liposomal irinotecan

A. V. Stadnichenko, Yu. M. Krasnopolsky, T. G. Yarnykh

Purpose. The influence of lipid concentration on encapsulation of the active substance and nanoparticle size was necessary to investigate for the creation of liposomal irinotecan form.

Materials and methods. We used “chemical gradient” method for liposomes formulation, in the variety of “pH gradient”. Ammonium citrate at pH 2.5 was used as internal buffer. Lipid film was obtained by evaporation technics with further high pressure homogenization with Microfluidics Microfluidizer M-110P apparatus. “Chemical gradient” was created by ultrafiltration, with “Minim 2” apparatus. Ultrafiltration cartridge with an upper cut-off 30 kDa was used. Encapsulation was measured using HPLC methods developed in variant

of gel chromatography, with Shimadzu LC-20 instrument. The particle size was measured by laser diffraction method with the "Zetasizer Nano ZS" instrument.

Results. Constant lipid ratio with varying of total lipid concentration was applied for the preparation of liposomes. The ratio of lipids in the experiment was a phosphatidylcholine / cholesterol 80/20 % by weight. A total concentration was investigated in range from 10 mg/ml to 30 mg/ml. The number of extrusion cycles consisted from 3 cycles at 1500 bar, in case of 10 mg/ml concentration, to 17 cycles at 1500 bar, in case of 30 mg/ml concentration.

Conclusions. It was shown that the lipid concentration from 25 mg/ml led to particles formation with size more than 5000 nm, and it was not possible to reduce them by high pressure homogenization method. It was proven that the most optimal, in terms of technology and the final characteristics of liposomes, were lipids in concentration 20 mg/ml. The degree of encapsulation in this case was 82 ± 0.98 %. The size of the liposomes was 106 nm, 5000 nm particles were absent.

Key words: liposomes, irinotecan, lipid bilayers, phosphatidylcholine, cholesterol, high pressure homogenization.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2017; 10 (1), 37–41

У сучасній фармацевтичній індустрії велика увага приділяється створенню нових, високотехнологічних лікарських засобів. Це втілюється в розробці нових лікарських речовин та створенні нових, досконаліших лікарських форм для застосування у практиці. Одні з таких об'єктів – ліпосоми, що є сферичними везикулами та складаються з ліпідного бішару, який оточує внутрішню порожнину з водним середовищем. Ліпосоми для медичного призначення є нанооб'єктами, їхній розмір коливається від 30 до 150 нм і залежить від методу отримання та складу. Унікальність ліпосом полягає в можливості застосовувати як гідрофільні, так і гідрофобні, водонерозчинні речовини [1,2]. Також відоме застосування ліпосом при створенні діагностичних препаратів [3]. Під час інкапсуляції водорозчинних компонентів вони перебувають у внутрішньому водному просторі ліпосом, при інкапсуляції водонерозчинних речовин розподіляються в гідрофобній частині ліпідного бішару, що сформований залишками жирних кислот.

Ліпосоми широко використовують під час створення лікарських форм речовин, котрі мають високі токсичні ефекти та подразнюють судини під час введення парентеральним методом [4]. Особливо це стосується речовин-цитостатиків, для яких ліпосомальна форма – один із найпоширеніших засобів понизити токсичний вплив на організм пацієнта при терапевтичному застосуванні [5,6]. Ліпосоми мають властивість зменшувати токсичні прояви цитостатиків як завдяки фосфоліпідам, що регенерують пошкоджені мембрани клітин, так і EPR ефекту (enhanced permeability effect). EPR ефект пояснюється швидким ростом пухлин. При запаленні та гіпоксії – явищах, котрі спостерігаються у пухлинних тканинах, ендотеліальна устїлка судин не встигає повноцінно розвиватися і має дефекти: розмір між клітинами, що дає змогу часткам розміром від 10 до 500 нм проходити через епітелій. При цьому наночастинки, що «навантажені» цитостатиками, накопичуються в міжклітинному просторі пухлини та вивільняють там лікарську речовину [7]. Це призводить до вибіркової дії препаратів і зменшує токсичні прояви для організму пацієнта.

Сучасним об'єктом для створення ліпосом є лікарська речовина іринотекан, що являє собою напівсинтетичну похідну камптотечину – алкалоїду природного походження, котрий видобувається з деревини *Camptotheca*

acuminata [8]. Структура іринотекану наведена на рисунку 1.

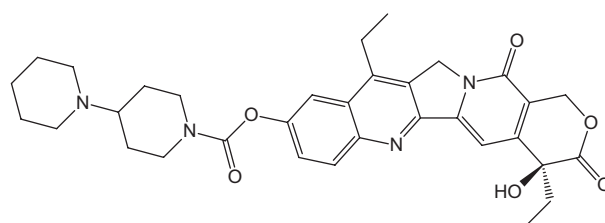


Рис. 1. Структурна формула іринотекану.

Молекула іринотекану під час введення в організм взаємодіє з комплексом ДНК–топоізомераза І і перешкоджає процесу синтезу ДНК. Це призводить до неможливості реплікації ДНК і, як наслідок, – до загибелі клітини [9]. Під час застосування іринотекану спостерігаються токсичні ефекти. Інкапсулювання в ліпосоми дає можливість зменшити побічні явища та поліпшити якість лікування [10].

Під час фармацевтичної розробки ліпосомальних форм одним із найважливіших питань залишається склад і концентрація ліпідів у мембрані. Дослідили вплив складу мембрани на показники інкапсуляції та розміру ліпосом. Завдання цієї роботи – проаналізувати вплив концентрації ліпідів мембрани на розмір ліпосом, ступінь інкапсуляції та оптимізувати цей показник для дальшої фармрозробки ліпосомальної форми іринотекану.

Мета роботи

Дослідження впливу концентрації ліпідів на розмір часток і ступінь інкапсуляції під час створення ліпосом з іринотеканом.

Матеріали і методи дослідження

Для експерименту використовували: яєчний фосфатидилхолін (Lipoid, ФРН); холестерин (Sigma-Aldrich, США). Ліпосоми зі складом ліпідного бішару фосфатидилхолін яєчний/холестерин 80/20 % масових одержували методом «хімічного градієнта». Ліпідну плівку отримували на ротаційному випарнику Buchi Rotovar R-210 із вакуум-контролером при остаточному тиску 15 мм рт. ст. Для гомогенізації використовували УЗ баню

«Сапфір» об'ємом 2,8 л, робочою частотою 35 кГц, потужністю генератора 130 Вт, екструдер Microfluidics Microfluidizer M-110P. Розмір ліпосом визначали методом лазерної дифракції на приладі Malvern Instruments «Zetasizer Nano ZS». Ультрафільтрацію здійснювали на установці «Minim 2» фірми PALL. Використовували ультрафільтраційні касети із верхньою межею відсікання 30 кДа. Визначення ступеня інкапсуляції проводили методом ВЕРХ на приладі Shimadzu LC-20 відповідно до раніше розробленої методики.

Результати та їх обговорення

Для створення ліпосом використали один із різновидів методу «хімічного градієнта» – «градієнт рН». При цьому методі при рН навколишнього буферного розчину в діапазоні 4,5–6 наявна рівновага:



При цьому частина молекул іринотекану перебуває в буферному розчині в молекулярному стані. Оскільки через бішар фосfolіпідів можуть проходити тільки незаряджені молекули, частина іринотекану в депротонованій (молекулярній) формі при абсорбції на поверхні дифундує всередину ліпосом. Внутрішній буферний розчин ліпосом із рН 2,5 містить іони цитрату. Після проходження через ліпідний бішар молекула іринотекану протонується, набуває позитивного заряду та втрачає можливість проходити через ліпідний бішар. Отже, відбувається накопичення іринотекану всередині ліпосом. Кількість накопичуваної всередині ліпосом речовини залежатиме від ємності навколишнього та внутрішнього буфера, тобто від показника градієнта, різниці рН між внутрішнім і зовнішнім буферними розчинами. Також важливим фактором є склад ліпідної мембрани. Раніше нами досліджено, що мембрана зі складом фосфатидилхолін/холестерин 80/20 % по масі має найкращі показники інкапсуляції. Цей склад використовували під час проведення експерименту.

Загальна концентрація іринотекану становила 2 мг/мл. Під час приготування ліпосом використовували концентрації ліпідів: 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 30 мг/мл. Екструзію здійснили до досягнення ліпосомами

розміру 100–120 нм при тиску 1500 атм. Після приготування 5 зразків вимірювали розмір ліпосом і ступінь інкапсуляції іринотекану. Результати вимірів наведені у таблиці 1.

Із таблиці 1 видно, що експерименти 1–3 показали зростання рівня інкапсуляції під час зростання концентрації ліпідів. Найбільший ступінь інкапсуляції визначено в експерименті № 3, він становив $82 \pm 0,98$ %. Експерименти № 4–5 показали ускладнення під час технологічного процесу. При концентрації ліпідів 25 мг/мл екструзія здійснюється важко, із нагрівом емульсії до 50 °С, при цьому на стадії ультрафільтрації при концентруванні розчину збільшується в'язкість емульсії та відбувається налипання ліпідів на ультрафільтраційні мембрани, що призводить до збільшення тиску та автоматичного відімкнення ультрафільтраційної установки. Під час концентрації ліпідів 30 мг/мл спостерігали ускладнення при екструзії: нерівномірний вихід емульсії після екструзії, забивання екструзійних камер приладу. Експерименти № 4 та 5 показали технологічні ускладнення при концентрації ліпідів 25 мг/мл та 30 мг/мл і неможливість позбавитися часток більше ніж 5000 нм. Вирішили не продовжувати екструзію при виконанні дослідів № 4 та 5 більше ніж 14 і 17 циклів відповідно для уникнення виходу з ладу гомогенізатора.

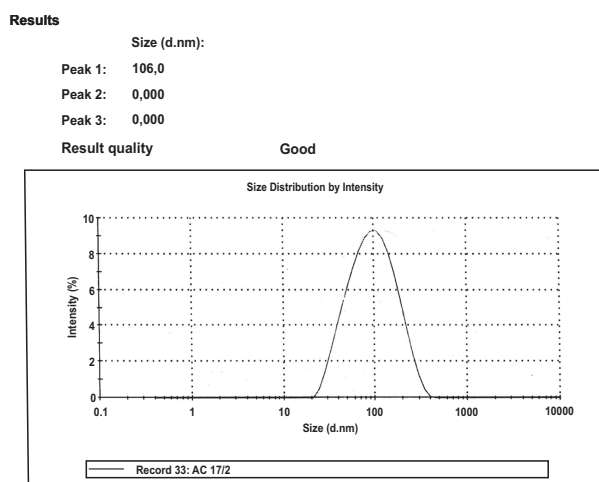


Рис. 2. Приклад вимірювань розміру ліпосом зі співвідношенням ліпідів фосфатидилхолін/холестерин 80/20 % масових і концентрацією 20 мг/мл.

Таблиця 1. Результати досліджень ліпосом з іринотеканом із різною концентрацією ліпідів

№	Концентрація фосfolіпідів, мг/мл	Кількість циклів екструзії	Розмір ліпосом, нм	Ступінь інкапсуляції, % $p = 0,05, n = 5$	Примітка
1	10	3	109	$55 \pm 0,65$	Частки більше ніж 220 нм відсутні
2	15	6	114	$78 \pm 0,93$	Частки більше ніж 220 нм відсутні
3	20	7	105	$82 \pm 0,98$	Частки більше ніж 220 нм відсутні
4	25	14	151	Не проводили	Наявні частки більше ніж 5000 нм. При екструзії та ультрафільтрації – в'язкий розчин.
5	30	17	Більше ніж 200	Не проводили	Наявні частки більше ніж 5000 нм. Ускладнення при екструзії

З експериментів 1–3, що показали задовільні результати, найперспективнішим є експеримент із концентрацією ліпідів 20 мг/мл – як за відсутністю технологічних перешкод, так і за показниками інкапсуляції та відсутності частин більше ніж 5000 нм після екструзії.

На *рисунку 2* наведений приклад вимірювань розміру ліпосом із співвідношенням ліпідів фосфатидилхолін/холестерин 80/20 % масових та концентрацією 20 мг/мл. Розмір ліпосом дорівнює 106 нм, пік розподілу часток по розмірах гомогенний, частки більше ніж 5000 нм – відсутні.

Концентрація ліпідів 20 мг/мл обрана для подальшої фармацевтичної розробки ліпосомальної форми ірино-текану.

Висновки

1. Досліджено 5 концентрацій ліпідної мембрани при співвідношенні ліпідів фосфатидилхолін/холестерин 80/20 % масових 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл і 30 мг/мл.

2. Для кожного дослідження визначено показники розміру часток і ступеня інкапсуляції. Досліджено, що концентрації ліпідів 25 мг/мл і 30 мг/мл призводять до технологічних ускладнень при роботі на обладнанні під час створення ліпосом.

3. Найбільший ступінь інкапсуляції визначений для ліпосомального зразка з концентрацією ліпідів 20 мг/мл. Ступінь інкапсуляції становив $82 \pm 0,98$ %. Розмір ліпосом при цьому становив 106 нм, частки більше ніж 5000 нм відсутні.

Список літератури

- [1] Frenzel M. Impact of quercetin and fish oil encapsulation on bilayer membrane and oxidation stability of liposomes / M. Frenzel, A. Steffen-Heins // *Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 185. – P. 48–57.
- [2] A lipid based multi-compartmental system: Liposomes-in-double emulsion for oral vaccine delivery / J.J. Liao, S. Hook, C.A. Prestidge et. al. // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2015. – Vol. 97. – P. 15–21.
- [3] The release of Doxorubicin from liposomes monitored by MRI and triggered by a combination of US stimuli led to a complete tumor regression in a breast cancer mouse model / S. Rizzitelli, P. Giustetto, D. Faletto et. al. // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – Vol. 230. – P. 57–63.
- [4] Reduced cytotoxicity and enhanced bioactivity of cationic antimicrobial peptides liposomes in cell cultures and 3D epidermis model against HSV / S. Ron-Doitch, B. Sawodny, R. Kühbacher et. al. // *J Control Release*. – 2016. – Vol. 10. – №229. – P. 163–171.
- [5] Kulkarni P.R. Liposomes: a novel drug delivery system / P.R. Kulkarni, J.D. Yadav, K.A. Vaidya // *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. – 2011. – Vol. 3. – №2. – P. 32–41.
- [6] Enhanced retention and anti-tumor efficacy of liposomes by changing their cellular uptake and pharmacokinetics behavior / Li Yan, Liu Ruiyuan, Yang Jun, Shi, Y., Ma, G., Zhang, Z., & Zhang, X. // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 41. – P. 1–14.
- [7] Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect / V. Torchilin // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2011. – Vol. 63. – P. 131–135.
- [8] Стадніченко О.В. Технологія получения ліпосомальних форм іринотекану (обзор) / А.В. Стадніченко, Ю.М. Краснопольський, В.И. Швець // *Біофармацевтичний журнал*. – 2014. – Т. 6. – №6. – С. 3–9.
- [9] West-Ward Pharmaceuticals Corp / Irinotecan prescribing information. [Electronic resource]. – 2016. – Retrieved from: <https://www.drugs.com/pro/irinotecan.html>.
- [10] Paulik A. Predictors of Irinotecan toxicity and efficacy in treatment of metastatic colorectal cancer / A. Paulik, J. Grim, S. Filip // *Acta Medica*. – 2012. – Vol. 55. – №4. – P. 153–159.

References

- [1] Frenzel, M., & Steffen-Heins, A. (2015) Impact of quercetin

and fish oil encapsulation on bilayer membrane and oxidation stability of liposomes. *Food Chemistry*, 185, 48–57. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.121.

- [2] Liao, J. J., Hook, S., Prestidge, C. A., & Barnes, T. J. (2015) A lipid based multi-compartmental system: Liposomes-in-double emulsion for oral vaccine delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 15–21. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.09.018.
- [3] Rizzitelli, S., Giustetto, P., Faletto, D., Delli Castelli, D., Aime, S., & Terreno, E. (2016) The release of Doxorubicin from liposomes monitored by MRI and triggered by a combination of US stimuli led to a complete tumor regression in a breast cancer mouse model. *Journal of Controlled Release*, 230, 57–63. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.03.040.
- [4] Ron-Doitch, S., Sawodny, B., Kühbacher, A., David, M. M., Samanta, A., Phopase, J., et al. (2016) Reduced cytotoxicity and enhanced bioactivity of cationic antimicrobial peptides liposomes in cell cultures and 3D epidermis model against HSV. *Journal of Controlled Release*, 10(229), 163–171. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.03.025.
- [5] Kulkarni, P. R., Yadav, J. D., & Vaidya, K. A. (2011) Liposomes: a novel drug delivery system. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(2), 32–41.
- [6] Li, Y., Liu, R., Yang, J., Shi, Y., Ma, G., Zhang, Z., & Zhang, X. (2015) Enhanced retention and anti-tumor efficacy of liposomes by changing their cellular uptake and pharmacokinetics behavior. *Biomaterials*, 41, 1–14. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.11.010.
- [7] Torchilin, V. (2011) Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 131–135. doi: 10.1016/j.addr.2010.03.011.
- [8] Stadnichenko, A. V., Krasnopoljskij, Y. M., & Shvets, V. I. (2014) *Tekhnologiya polucheniya liposomal'nykh form irinotekana (obzor)*. [Technology for production of liposomal irinotecan (a review)]. *Biofarmaceuticheskij zhurnal*, 6(6), 3–9. [in Russian].
- [9] West-Ward Pharmaceuticals Corp. (2016) Irinotecan prescribing information. Retrieved from: <https://www.drugs.com/pro/irinotecan.html>.
- [10] Paulik, A., Grim, J., & Filip, S. (2012) Predictors of Irinotecan toxicity and efficacy in treatment of metastatic colorectal cancer. *Acta Medica*, 55(4), 153–159. doi: 10.14712/18059694.2015.39.

Відомості про авторів:

Стадніченко О. В., канд. фарм. наук, каф. технології ліків, Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна.
Краснопольський Ю. М., д-р фарм. наук, професор, каф. «Біотехнологія, біофізика та аналітична хімія», Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Україна.

Ярних Т. Г., д-р фарм. наук, професор, каф. технології ліків, Національний фармацевтичний університет, м. Харків, заслужений діяч науки і техніки України.

Сведения об авторах:

Стадніченко А. В., канд. фарм. наук, каф. технологии лекарств, Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина.

Краснопольский Ю. М., д-р фарм. наук, профессор каф. «Биотехнология, биофизика и аналитическая химия», Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», Украина.

Ярных Т. Г., д-р фарм. наук, профессор, каф. технологии лекарств, Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, заслуженный деятель науки и техники Украины.

Information about the authors:

Stadnichenko A. V., Ph.D., Department of drug technology, National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine.

Krasnopsky Yu. M., Dr.hab., Professor, Department of Biotechnology, Biophysics and Analytical Chemistry, National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute", Ukraine.

Yarnykh T. G., Dr.hab., Professor, Honored person of Science and Technology of Ukraine, Department of drug technology, National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine.

E-mail: alstn@mail.ru

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 30.01.2017

Після доопрацювання / Revised: 01.02.2017

Прийнято до друку / Accepted: 08.02.2017