

## НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МАГНИТНЫХ ЛИПОСОМ, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ

Минаева О.В., Зырняева Н.Н., Куликов О.А., Жарков М.Н., Юрлов И. А.,  
Бродовская Е.П., Кокорев А.В., Малькина М.В.

*ФГБУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия, e-mail: dep-general@adm.mrsu.ru*

Исследованы распределение по размерам и стабильность магнитных липосом, полученных с помощью метода «обращения фаз» в двух модификациях. Первый способ заключался в добавлении ферромагнитных наночастиц в раствор липидов до упаривания. Второй способ — смывание липидных пленок водным буфером, содержащим взвесь наночастиц, после упаривания органического растворителя. Магнитные липосомы получали из фосфатидилхолина, холестерина и ферромагнитных наночастиц сложного оксида железа  $Fe_3O_4$ , стабилизированного цитратом натрия. Суспензии магнитных липосом, полученные по первому способу, отличались негетогенностью: сразу после приготовления в них выявлялись видимые агломераты и хлопья, которые делали невозможным проведение последующих измерений. Суспензии магнитных липосом, полученные по второму способу, отличались однородностью уже после сонификации. Полученные магнетолипосомальные суспензии стабильны в течение 10 суток хранения при температуре  $4^\circ C$  с последующим появлением признаков дестабилизации в виде расслоения и образования крупных агрегатов. Установлено, что методика получения липосом, предполагающая получение липидной пленки путем испарения органического растворителя из раствора исходных компонентов с последующей ее гидратацией водным раствором, обеспечивает большую однородность и стабильность липосом по сравнению с альтернативной методикой.

Ключевые слова: ферромагнитные наночастицы, магнитные липосомы, направленный транспорт, стабильность липосом

## SOME PHYSICOCHEMICAL AND PHARMACEUTICAL PROPERTIES OF MAGNETIC LIPOSOMES OBTAINED BY DIFFERENT METHODS

Minaeva O.V., Zyrnyaeva N.N., Kulikov O.A., Zharkov M.N., Jurlov I.A.,  
Brodovskaya E.P., Kokorev A.V., Malkina M.V.

*Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia, e-mail: dep-general@adm.mrsu.ru*

Size distribution and stability of magnetic liposomes obtained using two modifications of "reverse phase" method was studied. The first method consisted in the addition of ferromagnetic nanoparticles in the lipid solution before evaporation. The second is the washout of lipid films in water buffer containing a suspension of nanoparticles, after evaporation of organic solvent. Magnetic liposomes were obtained from phosphatidylcholine, cholesterol and ferromagnetic nanoparticles of complex iron oxide  $Fe_3O_4$  stabilized by sodium citrate. Suspension of magnetic liposomes obtained by the first method, different inhomogeneity: immediately after cooking, they identified the visible agglomerates and flakes that made it impossible to carry out subsequent measurements. Suspension of magnetic liposomes obtained by the second method, distinguished by its homogeneity after sonification. Magnetoliposomes obtained suspension is stable for 10 days of storage at  $4^\circ C$  followed by signs of destabilization in the form of delamination and the formation of large aggregates. We have shown that the method of obtaining liposomes, involving the receipt of lipid film by evaporation of organic solvent from a solution of initial components followed by its hydration with an aqueous solution, provides greater uniformity and stability of liposomes compared with alternative methods.

Keywords: ferromagnetic nanoparticles, magnetic liposomes, target transport, stability of liposomes

В настоящее время проводятся разработки по применению ферромагнитных наночастиц (ФНЧ) для направленной доставки лекарственных препаратов, индукционной гипертермии и различных диагностических методов [6, 7, 9]. С целью повышения эффективности доставки ФНЧ и снижения их токсичности применяется инкорпорирование ФНЧ в различные биосовместимые контейнеры [1, 4, 8]. Наибольшее распространение

получили липосомы [2, 5]. Наиболее распространен метод получения липосом с помощью обращения фаз, когда липиды предварительно растворяются в органическом растворителе (чаще всего в хлороформе), упариваются для образования пленок, которые затем регидратируются водным раствором включаемого вещества. При изготовлении магнитных липосом (МЛ) также необходимо включение в них ФНЧ. Возможны 2 способа включения.

1. Методика двойных эмульсий: формирование первичной эмульсии путем добавления ФНЧ в раствор липидов, которая затем упаривается на роторном испарителе для удаления органического растворителя, с дальнейшей дополнительной обработкой ультразвуком (сонификация) и/или продавливание ее через фильтры нанодиапозона (экструзия).

2. Методика регидратации тонких пленок: получение тонких липидных пленок при удалении органического растворителя из липосомальной дисперсии (дегидратация на роторном испарителе) с последующей регидратацией липидных пленок водным буфером, содержащим ФНЧ, а также сонификация и/или экструзия [3].

Любой химический препарат должен быть охарактеризован по ряду специфических свойств, которые необходимо знать при выполнении поставленных целей и задач в научно-исследовательской работе. При этом в литературе мы не встретили сравнения этих вариантов получения липосом, а также изменения физико-химических и фармацевтических свойств контейнеров в зависимости от метода их получения.

### **Цель работы**

Изучить физико-химические и фармацевтические свойства магнитных липосом, полученных разными методами.

### **Материалы и методы исследования**

МЛ получали из яичного фосфотидилхолина (ФХ) и холестерина (ХС) (Sigma Aldrich, США), а также ФНЧ. ФНЧ — это коллоидный раствор магнетита  $Fe_3O_4$  со средним диаметром частиц  $13,5 \pm 4,1$  нм, концентрация магнетита в пересчете на  $Fe_3O_4$  2,76 мг/л. Магнитные частицы получали соосаждением магнетита из растворов сульфата железа (II) и хлорида железа (III) в щелочной среде с последующей стабилизацией цитратом натрия. Манипуляции с липидами и ФНЧ выполняли в атмосфере азота.

В ходе работы магнитные липосомы получали по методу обращения фаз 2 способами.

*Первый способ.* Коллоидный раствор магнетита добавляли к раствору липидов в соотношении 1:4 по объему (0,138 мг  $Fe_3O_4$  на 1 мг суммарных липидов), затем полученную смесь упаривали на роторном испарителе. Регидратировали суспензию деионизированной дистиллированной водой. Полученную суспензию подвергали «озвучиванию» в течение 15 мин с частотой  $\approx 25$  кГц (УЗ-установка «Сапфир-1,3», Россия). После сонификации в образец

добавляли 0,9%-ный раствор хлорида натрия, центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин для выпадения в осадок ФНЧ, которые отбрасывали.

*Второй способ.* Липиды (ФХ и ХС в молярном соотношении 10:1) растворяли в хлороформе до концентрации 5 мг/мл в пересчете на суммарные липиды; затем растворитель упаривали на роторном испарителе Laborota 4000 eco (Heidolph, Германия). Липидную пленку получали гидратацией раствором коллоидного магнетита в течение 30 мин при 40°C (соотношение липиды: магнетит 1:0,14 по массе). Таким способом получали эмульсию мультиламеллярных липосом с инкорпорированными коллоидными частицами магнетита. Последующие этапы обработки (сонификация, центрифугирование) проводились аналогично первому варианту.

Стабильность (степень агрегации) оценивалась по изменению среднего диаметра частиц в растворе в динамике: непосредственно в день приготовления и через 2, 7, 14 и 20 суток. Суспензию магнитных липосом хранили при температуре 4°C. Размер липосомальных частиц определяли методом динамического светорассеяния (анализатор NANO-flex, Microtrac, США). Количество включившегося магнетита в липосомы определяли фотоколориметрическим методом (спектрофотометр УФ и видимой области UV-2600 SHIMADSU, Япония).

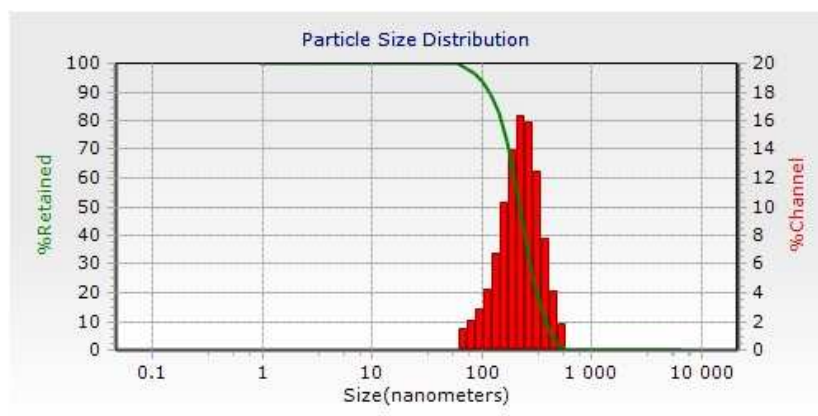
### **Результаты исследования и их обсуждение**

Суспензии МЛ, полученные по первому способу, отличались неомогенностью: сразу после приготовления в них выявлялись видимые агломераты и хлопья, которые делали невозможным проведение последующих измерений. Поэтому нами была предпринята попытка улучшить полученные результаты с помощью экструзии МЛ через поликарбонатные фильтры уменьшающегося диаметра (до 100 нм). После экструзии структура суспензии стабилизировалась: однородная, средний размер частиц составлял  $133\pm 18$  нм.

Уже через 7 суток после хранения наблюдалась частичная преципитация, средний размер частиц в супернатанте составил  $228\pm 33$  нм.

Через 14 и 21 сутки хранения в суспензии появлялись видимые глазом сгустки, плохо поддающиеся разбиванию при шейкировании. Средний размер частиц составил  $1205\pm 456$  нм.

Суспензии МЛ, полученные по второму способу, отличались однородностью. Результаты исследования стабильности сравниваемых образцов базовых эмульсий представлены на рисунке 1.

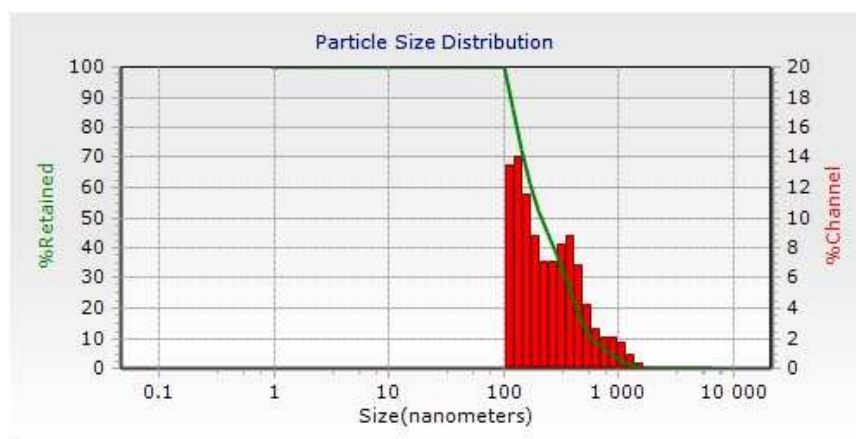


*Рис. 1. Распределение по размерам частиц свежей суспензии МЛ*

Видно, что свежие магнитолипосомальные суспензии были достаточно однородными. Средний размер частиц в образцах составлял  $182 \pm 88$  нм.

После 2 суток хранения визуально определяемых изменений суспензий МЛ не наблюдалось, размер частиц составлял  $254 \pm 94$  нм. Как в свежих суспензиях, так и после 2 суток их хранения крупных агрегатов не определялось.

Через неделю хранения в образцах появились признаки дестабилизации в виде расслоения эмульсии. Средний диаметр липосом составил  $463 \pm 302$  нм. Обращало на себя внимание появление дополнительного пика в области 800 нм, связанного с появлением крупных агрегатов частиц липосомальной суспензии (рис. 2). Общее число агрегированных (более 600 нм) частиц в суспензии составило  $11,9 \pm 2,8\%$



*Рис. 2. Распределение по размерам частиц МЛ через 7 суток хранения*

Через 14 суток хранения в суспензии появлялись видимые глазом хлопья и сгустки. После встряхивания на шейкере в течение 3 мин хлопья и сгустки разрушались, что позволило провести исследование размеров частиц образца. Средний размер частиц составил  $654 \pm 337$  нм. Происходили уширение основного пика и рост площади дополнительного (рис. 3). Количество агрегированных частиц увеличивалось до 30%.

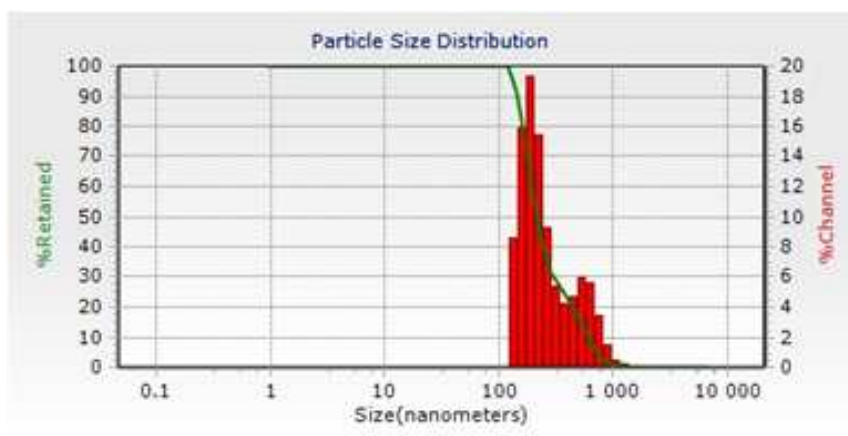


Рис. 3. Распределение по размерам частиц МЛ через 14 суток хранения

Через 21 сутки хранения количество хлопьев в суспензии увеличивалось. Хлопья и сгустки не полностью разрушались при шейкировании, поэтому для определения размеров проводили предварительное центрифугирование суспензии при 1500 g в течение 5 мин и исследовали надосадок. Средний размер частиц составил  $955 \pm 429$  нм. Причем площадь «правого» пика была больше, чем «левого» (рис. 4). Это свидетельствовало о том, что большинство частиц находились в агрегированном состоянии. Доля частиц диаметром более 600 нм была равна 76,5%.

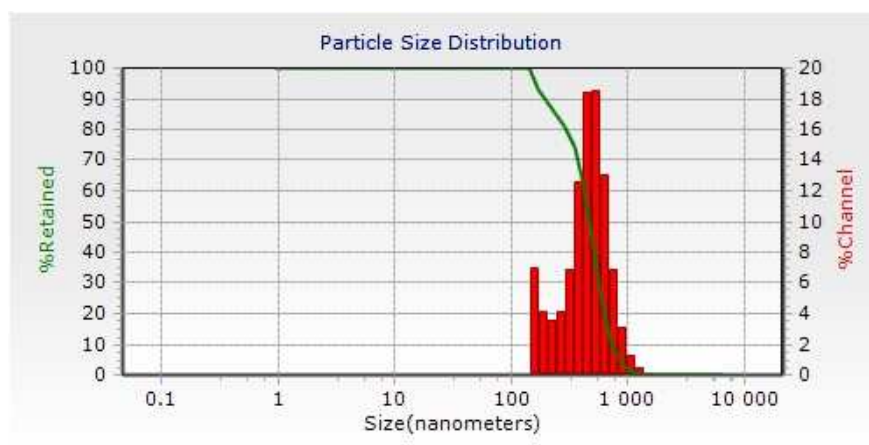


Рис. 4. Распределение по размерам частиц МЛ через 21 сутки хранения

Также нами была проведена сравнительная оценка включения частиц магнетита в липосомы, полученные методом экструзии через поликарбонатные мембраны с размерами пор 200 и 400 нм.

Степень включения оценивали по количеству включенного в липосомы магнетита и рассчитывали по формуле:

$$w = ((m - m')/m) \cdot 100\%$$

где  $m$  – масса (мг) магнетита взятого на синтез,  $m'$  – масса (мг) магнетита, не включившегося в липосомы.

Результаты представлены в таблице.

Степень включения частиц магнетита в липосомы в зависимости от выбора фильтра

| Метод экструзии | Размер пор фильтра, нм | № образца | Масса магнетита, взятого для одного синтеза липосом, мг | Масса магнетита, включившегося в липосомы(5 мл эмульсии), мг | Степень включения, % | Среднее значение | Стандартное отклонение | Отн. стандартное отклонение |
|-----------------|------------------------|-----------|---|--|----------------------|------------------|------------------------|-----------------------------|
|                 | 200                    | 1         | 32  | 12,5   | 39                   | 38,1             | 0,8                    | 1,9                         |
|                 |                        | 2         | 32  | 11,9   | 37,2                 |                  |                        |                             |
|                 |                        | 3         | 32  | 12,2   | 38,1                 |                  |                        |                             |
|                 | 400                    | 1         | 32  | 18,6   | 58,1                 | 60,1             | 1,8                    | 3,0                         |
|                 |                        | 2         | 32  | 20   | 62,5                 |                  |                        |                             |
|                 |                        | 3         | 32  | 19,1   | 59,7                 |                  |                        |                             |

По результатам анализа эффективности включения частиц магнетита в липосомы пришли к выводу, что увеличение степени включения магнитного компонента с заменой фильтра (с 200 нм на 400 нм) связано с отношением размеров получаемых везикул и частиц магнетита.

### **Заключение**

Метод получения магнитных липосом влияет на их размер и стабильность. Способ изготовления липосом, который подразумевает получение липидной пленки путем испарения органического растворителя из раствора исходных компонентов с последующей ее гидратацией водным раствором, позволяет получить более однородные и стабильные липосомы, а также исключает дополнительный этап экструзии. При этом полученные магнитолипосомальные суспензии стабильны в течение 10 суток хранения при температуре 4°C. В последующем появляются признаки дестабилизации в виде расслоения и образования крупных агрегатов.

### **Список литературы**

1. Краснопольский Ю.М. Липидная технологическая платформа для создания новых лекарственных форм и транспорта активных фармацевтических субстанций/ Ю.М. Краснопольский, А.Е. Степанов, В.И. Швец // Биофармацевтич. журнал. — 2011. — Т. 3, № 2. — С. 50.

2. Пятаев Н.А. Таргетная фармакотерапия / Н.А. Пятаев, К.Г. Гуревич, Скопин П.И. и др. // Медицина критических состояний. — 2010. — № 5. — С. 3.
3. Пятаев Н.А. Взаимодействие магнитной жидкости на основе коллоидного магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> с некоторыми цитостатическими препаратами / Н.А. Пятаев, П.С. Петров, Н.Н. Зырняева и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2012. — Т. 11, № 2. — С. 44.
4. Chen C. The freeze-thawed and freeze-dried stability of cytarabine-encapsulated multivesicular liposomes / C.Chen, D.Han, Zhang Y. et al. // Int. J. Pharm. – 2010. – P. 147–153.
5. Fang J., Nakamura H., Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect // Adv. Drug Del. Rev. — 2011. — Vol. 63, № 3. — P. 136–151.
6. Ingrid Hilger. In vivo applications of magnetic nanoparticle hyperthermia / Ingrid Hilger// International Journal of Hyperthermia. — 2013. — P. 828–834.
7. L. Harivardhan Reddy. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications / L.Harivardhan Reddy, José L. Arias, Julien Nicolas et al. //Chem. Rev. — 2012. — Vol.112 (11). — P. 5818–5878.
8. Kuznetsova N. Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer/ N.Kuznetsova, C.Sevrin, D.Lespineux et al. // J. Control. Release. — 2012. — Vol. 160. — P. 394–400.
9. Xin Yao. Evaluation of magnetic heating of asymmetric magnetite particles/Xin Yao, Kairat Sabyrov, Todd Klein et al.//Journal of Magnetism and Magnetic Materials. — 2014.

**Рецензенты:**

Инчина В.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии Медицинского института ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева» Минобрнауки России, г. Саранск;

Эпштейн Н.Б., д.ф.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и радиофармацевтической химии ИАТЭ НИЯУ «МИФИ» Минобрнауки России, г. Москва.