

Agata METERA¹, Agnieszka MARKOWSKA-RADOMSKA¹, Ewa DŁUSKA¹, Konrad KOSICKI², Barbara TUDEK², Tomasz FRĄCZYK³

e-mail: ewa.dluska@pw.edu.pl

¹ Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

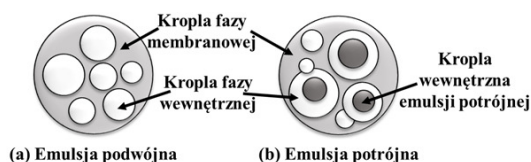
² Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

³ Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

Emulsje podwójne i potrójne z modyfikowanymi powierzchniami kropeł jako nośniki substancji czynnych

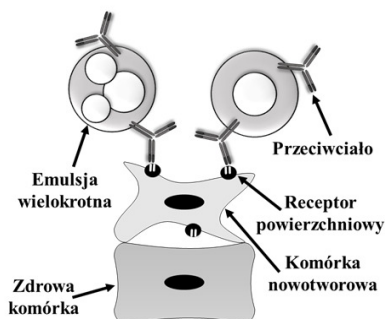
Wstęp

Emulsje wielokrotne mogą być wykorzystywane jako nośniki substancji leczniczej, dzięki hierarchicznie rozproszonej strukturze wewnętrznej (Rys. 1). W emulsji podwójnej występują dwie fazy wewnętrzne tj. krople wewnętrzne rozproszone są w większych kroplach fazy membranowej. Natomiast w emulsji potrójnej obserwowane są trzy fazy rozproszone. Im więcej faz rozproszonych tym wyższa rzędowość struktury emulsji.



Rys. 1. Emulsje wielokrotne (a) podwójne, (b) potrójne

Nośniki leku mogą być wykorzystywane w procesie biernego transportu substancji. Dzięki modyfikacji powierzchni nośnika białkami (np. przeciwciałami) może być realizowany transport celowany substancji w terapiach przeciwnowotworowych (Rys. 2) [Bertrand i in., 2014].



Rys. 2. Transport celowany emulsyjnych nośników leków do komórek nowotworowych

Modyfikacja powierzchni kropeł emulsji prostej typu olej w wodzie prowadzona jest m.in. na drodze adsorpcji fizycznej lub chemicznej białek. Do oceny adsorpcji fizycznej białek wykorzystuje się np. dwuwymiarową elektroforezę żelową (2D-PAGE) [Blunk i in., 1993] czy izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC) [Derksen i in., 1996]. Natomiast w badaniach adsorpcji chemicznej białek użyteczne są testy z kwasem bicinechinowym (BCA) oraz obserwacje z wykorzystaniem elektornowego mikroskopu transmisyjnego (TEM) [Goldstein i in., 2007].

Celem badań był dobór metody do oceny procesu adsorpcji fizycznej białka (przeciwciała) na powierzchni emulsyjnych nośników substancji czynnej.

Badania doświadczalne

Materiały

Skład emulsji wielokrotnych do badań adsorpcji przeciwciała podano w tab.1. Wykorzystano przeciwciała (*anti-CD15* (cząsteczki hydro-filo-wodofobowe (*SantaCruz Biotechnology*)) rozpuszczone w buforze fosforanowym (PBS) (*Sigma-Aldrich*) z dodatkiem < 0.1 wag. % azydku sodu (*Sigma-Aldrich*) i 0.1 wag. % żelatyny (*Sigma-Aldrich*).

Tab. 1. Skład faz emulsji wielokrotnych

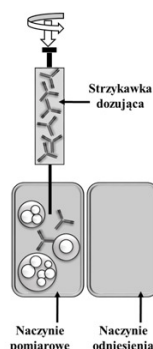
Faza	Skład emulsji wielokrotnej
wewnętrzna	woda destylowana, 2% mas. alginian (<i>Sigma-Aldrich</i>), 0,25% mas. <i>Poloxamer 407</i> zamiennie z <i>Pluronic P-123</i> (<i>Sigma-Aldrich</i>)
membranowa	olej sojowy (<i>Basso</i>), 2% mas. <i>Span 83</i> (<i>Sigma-Aldrich</i>)
zewewnętrzna	woda destylowana, 0,25% mas. <i>Tween 80</i> (<i>Sigma-Aldrich</i>), 0,2% mas. karboksymetyloceluloza sodowa (CMC) (<i>Merck</i>), 0,25% mas. <i>Poloxamer 407</i> zamiennie z <i>Pluronic P-123</i> (<i>Sigma-Aldrich</i>)

Wytwarzanie i badania emulsji wielokrotnych

Emulsje wielokrotne wytwarzano w aparacie z przepływem helioidalnym [Dłuska i Markowska-Radomska, 2010; Markowska-Radomska i Dłuska, 2016]. Szczelina pomiędzy współosiowymi cylindrami miała szerokość 1,5 mm. Przepływy faz wynosiły: f. wewnętrznej – 10 cm³/min, f. membranowej – 10 cm³/min, f. zewnętrznej – 150 cm³/min. Obrotów cylindra wewnętrznego aparatu zmieniano w zakresie 1800÷2350 obr/min. Obserwacje mikroskopowe emulsji prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu *Olympus BX-60* połączonego z kamerą *Olympus SC50*. Na podstawie zdjęć mikroskopowych i za pomocą oprogramowania *Image Pro Plus 4.5* (*Media Cybernetics*) zmierzono 800÷1000 kropeł każdej z faz emulsji i wyznaczono rozkłady ich rozmiarów. Badania cytotoksyczności składników emulsji w stosunku do badanych komórek przeprowadzono dla linii *K21* (fibroblasty) i *U-87 MG* (glejak). Do standardowej hodowli komórek na płytce 96-dołkowej dodawano 1:20 (v/v) emulsję, po 24 h określano przeżywalność komórek na podstawie standardowego testu *Alamar Blue*.

Izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC)

W badaniach korzystano z kalorymetru *NanoITC* (*TA Instruments*) ze stalowym naczyńcem pomiarowym, objętość naczynia pomiarowego wynosiła 950·10⁻⁶ dm³, objętość roztworu w strzykawkę dozującej – 250·10⁻⁶ dm³, stężenie przeciwciała w roztworze do miareczkowania – 3,39·10⁻⁴ mM (Rys. 3). Badania oddziaływań międzycząsteczkowych prowadzono w temperaturze 37 °C, mieszając emulsję z przeciwciałem (oraz wszystkie badane układy) przy częstotliwości obrotowej 250 obr/min za



Rys. 3. Schemat aparatury do izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego

pomocą igły strzykawkowej dozującej o specjalnej budowie pełniącej również rolę mieszadła. Podczas miareczkowania dodano 18 właściwych porcji roztworu przeciwciała każda o objętości 13,14·10⁻⁶ dm³, kolejne porcje roztworu dodawano, co 1000 s. Pierwsza (dodatkowa) porcja roztworu przeciwciała podawana jest w celu stabilizacji pracy kalorymetru. Naczynie odniesienia wypełnione było wodą destylowaną, ponieważ badano oddziaływanie emulsji z wodną fazą zewnętrzną i wodnego roztworu przeciwciała.

W związku z tym, że badane układy są układami wielofazowymi i wieloskładnikowymi konieczne było zbadanie wszystkich mierzalnych oddziaływań w celu wyeliminowania oddziaływań innych (tło – Tab. 2) niż poszukiwane tj. krople emulsji-cząsteczki przeciwciała.

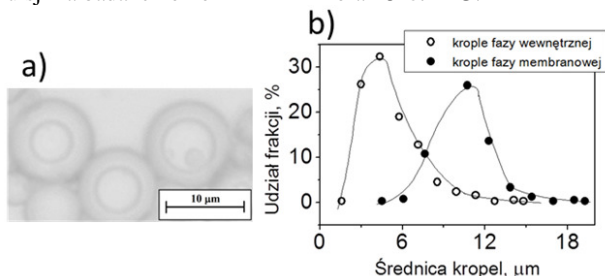
Tab. 2. Badane oddziaływania tła, tj. oddziaływań innych niż kropla-przeciwciała

Seria	Zawartość naczynia pomiarowego	Zawartość strzykawki dozującej
T1	Emulsja wielokrotna	Bufor dodawany do roztworu przeciwciała (bez przeciwciała)
T2	Faza zewnętrzna emulsji wielokrotnej	Roztwór przeciwciała w buforze
T3	Faza zewnętrzna emulsji wielokrotnej	Bufor dodawany do roztworu przeciwciała (bez przeciwciała)

Wyniki i ich analiza

Emulsje wielokrotne

Wytworzono emulsje wielokrotne podwójne i potrójne. Do badań adsorpcji fizycznej przeciwciał na powierzchni kropeł membranowych emulsji podwójnej wybrano emulsję $W_1/O/W_2$ stabilizowaną *Poloxamerem 407*, wytwarzaną przy częstotliwości obrotowej 2162 obr/min (Rys. 4). Średnice *Sautera* kropeł faz wynosiły odpowiednio: wewnętrznej – 7,1 μm , membranowej – 11,0 μm . Badania cytotoxyczności nie wykazały toksycznego działania składników faz emulsji na badane komórki linii *K21* oraz *U-87 MG*.

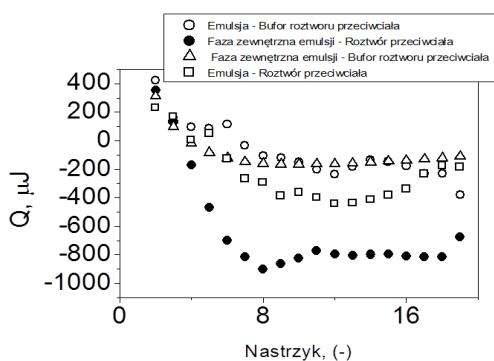


Rys. 4. Emulsji podwójna wybrana do badań ITC: obraz mikroskopowy (a), rozkład rozmiarów kropeł (b)

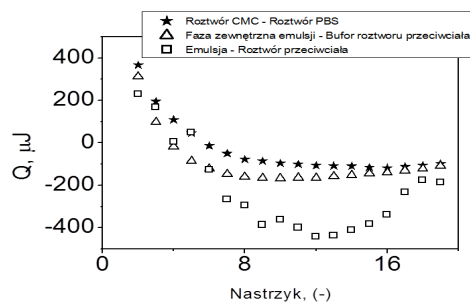
Badania oddziaływań przeciwciała i kropeł emulsji

Zmierzono efekt cieplny (Q) oddziaływań emulsji podwójnej z roztworem przeciwciała. Wyniki pomiarów oddziaływań tła serii T1, T2, T3 (Tab.2) pozwoliły na określenie udziału mierzonych efektów cieplnych tła i wyznaczenie oddziaływania pomiędzy kroplami fazy membranowej emulsji a przeciwciałem (Rys. 5).

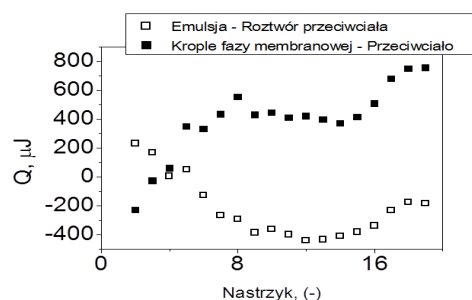
Zmierzono efekt cieplny oddziaływań pomiędzy łańcuchami karboksymetylocelulozy (CMC) i jonami w buforze fosforanowym (PBS), jest to główny mierzony efekt cieplny oddziaływań tła (Rys. 6). Efekt cieplny oddziaływań pomiędzy kroplami fazy membranowej emulsji a przeciwciałem (Rys. 7) wyznaczono odejmując od efektu cieplnego wszystkich oddziaływań w badanym układzie efekty oddziaływań zmierzone w seriach pomiarowych T1 oraz T2 (Tab. 2). W obu pomiarach ukryta jest wartość pomiaru serii T3 (Tab. 2), dlatego konieczne było dodanie zmierzonych w tej serii efektów cieplnych.



Rys. 5. Efekty cieplne składowych oddziaływań (seria T1, T2, T3) tle sumarycznych oddziaływań w układzie składniki emulsji i roztworu przeciwciała



Rys. 6. Efekty cieplne składowych oddziaływań na tle oddziaływań sumarycznych w układzie składniki emulsji i roztworu przeciwciała



Rys. 7. Efekt cieplny poszukiwanych oddziaływań krople fazy membranowej i przeciwciała na tle sumarycznych oddziaływań składników emulsji i roztworu przeciwciała

Wnioski

Metoda ITC pozwala na zmierzenie efektu cieplnego oddziaływań pomiędzy kroplami fazy membranowej emulsji a przeciwciałem.

Emulsje wielokrotne z osadzonym na powierzchni kropeł przeciwciałami są potencjalnymi nośnikami leków w procesie celowanego transportu substancji w terapiach przeciwnowotworowych.

LITERATURA

- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., Farokhzad, O. C., (2014). Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 66, 2-25. DOI: 10.1016/j.addr.2013.11.009
- Blunk, T., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C., Müller, B. W., Müller, R. H., (1993). Colloidal carriers for intravenous drug targeting: Plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 14(1), 1382-1387. DOI: 10.1002/elps.11501401214
- Derksen, A., Gantz, D., Small, D. M. (1996). Calorimetry of apolipoprotein-A1 binding to phosphatidylcholine-triolein-cholesterol emulsions. *Biophys. J.*, 70(1), 330-338. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79574-7
- Dłuska E., Markowska-Radomska A., (2010). Regimes of multiple emulsions of $W_1/O/W_2$ and $O_1/W/O_2$ type in the continuous Couette-Taylor flow contactor, *Chem. Eng. Technol.*, 33(1), 113-120. DOI: 10.1002/ceat.200900278
- Goldstein, D., Sader, O., Benita, S., (2007). Influence of oil droplet surface charge on the performance of antibody-emulsion conjugates., *Biomed. Pharmacother.*, 61(1), 97-103. DOI: 10.1016/j.biopha.2006.08.005
- Markowska-Radomska A., Dłuska E., (2016). An evaluation of a mass transfer rate at the boundary of different release mechanisms in complex liquid dispersion, *Chem. Eng. Process.*, 101, 56-71. DOI: 10.1016/j.cep.2015.12.006

Praca była finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych w ramach projektu nr 2014/13/B/ST8/04274. Zakup aparatury ITC współfinansowano przez Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CePT) ze środków Europejskiego Funduszu Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013.