

Agata METERA, Agnieszka MARKOWSKA-RADOMSKA, Ewa DŁUSKA

e-mail:agata.metera.dokt@pw.edu.pl

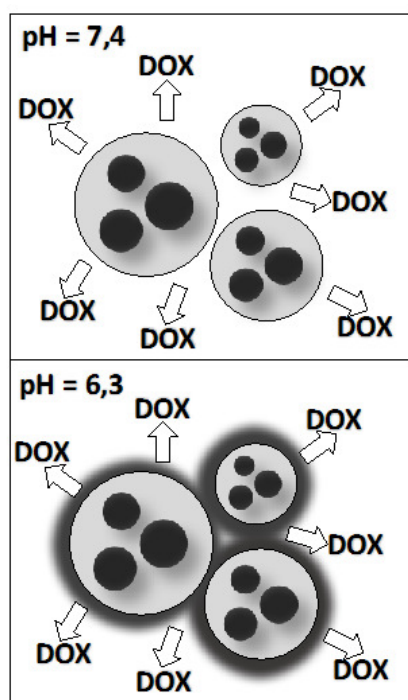
Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Wymiana masy w układach rozproszonych do zastosowań biomedycznych

Wstęp

Transport składników biologicznie czynnych w nowych terapiach nowotworów realizowany może być poprzez wykorzystanie nośników w postaci układów rozproszonych. Skład i struktura nośnika dobrane są tak, aby intensyfikować transport substancji leczniczej w miejscach zmienionych chorobowo [Bertrand i in., 2014]. Środowisko guza nowotworowego różni od zdrowej tkanki m.in. pH na zewnątrz komórek. W zdrowych tkankach pH zewnątrzkomórkowe przyjmuje wartości z zakresu 7,3÷7,4, natomiast w guzie nowotworowym pH jest niższe i wynosi 6,2÷6,9. Przyspieszony metabolizm i intensywny wzrost komórek nowotworowych przyczyniają się do zakwaszenia ich środowiska [Vaupel, 2004; Cardone i in., 2004].

Celem pracy było wytworzenie ciekłych wielofazowych i selektywnych nośników chemoterapeutyku w postaci emulsji wielokrotnych i zbadanie szybkości jego uwalniania w różnych warunkach pH z emulsji o różnych rozmiarach kropeł (Rys. 1).



Rys. 1. Uwalnianie chlorowodoru doksorubicyny (DOX) z emulsji wielokrotnej w warunkach pH 7,4 oraz pH 6,3

Badania doświadczalne

Wytwarzanie i badania emulsji wielokrotnych

Skład faz emulsji wielokrotnych i warunki ich wytwarzania podczas badań uwalniania chlorowodoru doksorubicyny (DOX) podano w tab. 1. Emulsje wytwarzano w biokontaktorze z przepływem helikoidalnym [Dłuska i Markowska-Radomska, 2010]. W przypadku obu emulsji (E1 i E2) kontaktor zasilano trzema różnymi strumieniami faz. Szczelina pomiędzy współosiowymi cylindrami kontaktora miała szerokość 1,5 mm.

Obserwacje mikroskopowe wytwarzanych emulsji prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu Olympus BX-60 z kamerą Olympus SC50.

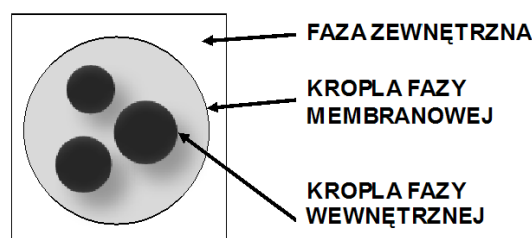
Tab. 1. Warunki wytwarzania oraz skład faz emulsji wielokrotnych

| Emulsja: | | E1 | E2 |
|--|---------------|--|------------|
| Przepływ fazy: [cm ³ /min] | wewnętrznej | 15 | 10 |
| | membranowej | 30 | 10 |
| | zewewnętrznej | 60 | 150 |
| Częstość obrotów cylindra kontaktora [obr/min] | | 2160 | 2160 |
| Skład fazy: | wewnętrznej | woda destylowana, 2% mas. alginian, 0,25% mas. Pluronic P-123 | |
| | | DOX 69,9 μM | DOX 170 μM |
| | membranowej | olej sojowy, 2% mas. Span 83 | |
| | zewewnętrznej | woda destylowana, 0,25% mas. Tween 80, 0,2% mas. Sól sodowa karboksymetylocelulozy (Na-CMC), | |
| 0,25% mas. Pluronic P-123 | | 0,14% mas. Poloxamer 407, 0,11% mas. Pluronic P-123 | |

Za pomocą oprogramowania Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics) przeprowadzono analizę wykonanych zdjęć mikroskopowych emulsji. Zmierzono 800÷1000 kropeł badanych emulsji, i na tej podstawie wyznaczono rozkłady ich rozmiarów. Ocena cytotoksyczności nośnika oraz dobór dawek zostały wykonane w ramach wcześniejszych badań [Dłuska i in., 2017].

Uwalnianie chlorowodoru doksorubicyny z emulsji wielokrotnych

Prowadzono badania uwalniania DOX zamkniętego w kroplach fazy wewnętrznej (Rys. 2) emulsji podwójnej $W_1/O/W_2$ (W – faza wodna, O – faza olejowa).



Rys. 2. Emulsja wielokrotna $W_1/O/W_2$

Uwalnianie DOX prowadzono w środowisku buforu fosforanowego (PBS) o pH 7,4 – środowisko komórek zdrowych oraz PBS o pH 6,3 – środowisko komórek chorych. Emulsje dodawano do PBS w proporcji objętościowej 1:100 (emulsja : PBS).

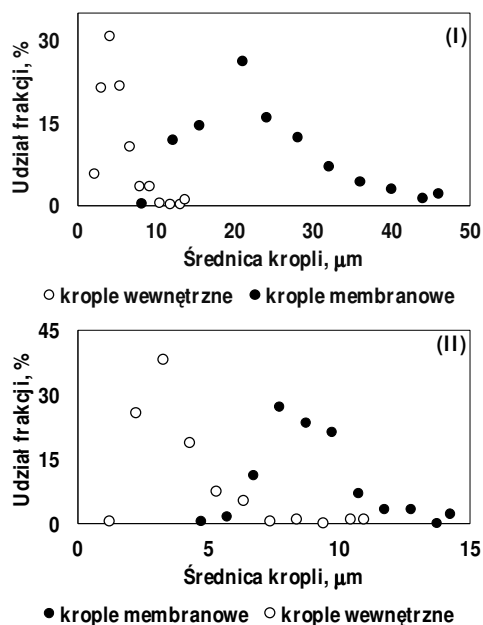
Podczas uwalniania objętość pojedynczej próbki wynosiła 1 cm³, a temperatura: 37°C. W czasie uwalniania pobierano kolejne próbki emulsji rozproszonej w PBS, aby wyznaczyć profil zmian stężenia substancji uwalnianej w czasie. Uwalnianą DOX oznaczano spektrofotometrycznie (E_x 488nm/ E_m 593nm).

Wyniki i ich analiza

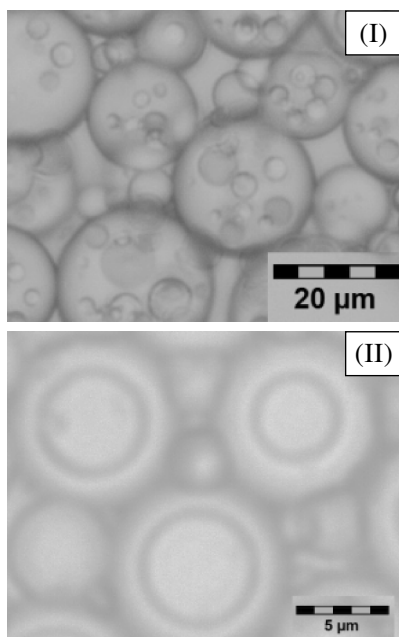
Emulsje wielokrotne

Do badań uwalniania DOX w dawce 100 nM wybrano dwie emulsje różniące się wielkością kropeł. Emulsja E1 charakteryzowała się większymi rozmiarami kropeł fazy membranowej i fazy wewnętrznej w porównaniu z rozmiarami kropeł emulsji E2. Dla emulsji E1 średnica Sautera kropeł membranowych wynosiła $D_{32} = 28,6 \mu\text{m}$,

wewnętrznych – $d_{32} = 6,8 \mu\text{m}$. w przypadku emulsji E2 średnica *Sautera* kropeł membranowych wynosiła $D_{32} = 9,5 \mu\text{m}$, a wewnętrznych $d_{32} = 5,5 \mu\text{m}$. Rozkłady rozmiarów kropeł emulsji E1 i E2 przedstawiono na rys.3, a przykładowe zdjęcia mikroskopowe emulsji na rys. 4.



Rys. 3. Rozkład rozmiarów kropeł emulsji E1 (I) oraz E2 (II)

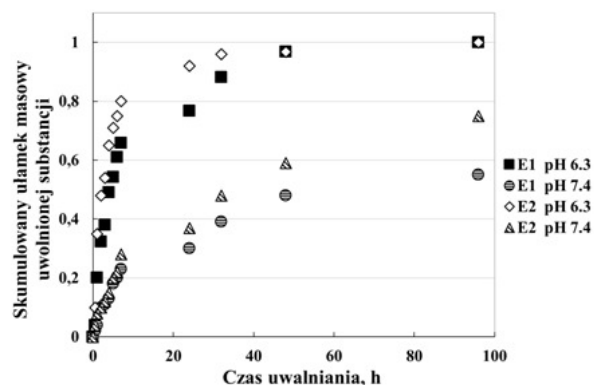


Rys. 4. Przykładowe zdjęcia mikroskopowe emulsji E1 (I) oraz E2 (II)

Stopień enkapsulacji DOX w emulsji E1 wynosił 97,4%, a w emulsji E2 95,5%. Biopolimer – sól sodowa karboxymetylocelulozy (Na-CMC) był w obu emulsjach składnikiem umożliwiającym badanie odpowiedzi układu na zmiany *pH*.

Badania uwalniania chlorowodoru doksorubicyny z emulsji wielokrotnych

W przypadku obu emulsji DOX uwalniała się szybciej w środowisku kwaśnym przy *pH* 6,3 (symulowane środowisko guza), w porównaniu z uwalnianiem prowadzonym w środowisku o *pH* 7,4 (symulowane środowisko zdrowych komórek). Wykazano to na rys. 5.



Rys. 5. Profile uwalniania DOX z emulsji E1 i E2 w PBS o *pH* 7,4 i PBS o *pH* 6,3

Różnice szybkości uwalniania w różnych *pH* wynikają ze zmiany właściwości fizykochemicznych biopolimeru (Na-CMC), która jest głównym składnikiem faz zewnętrznych obu emulsji. W środowisku kwaśnym obecne są dodatkowe jony, które powodują zwijanie łańcuchów polimeru i tym samym zmniejszenie jego lepkości, co wpływa na szybkość transportu. W środowisku obojętnym polimer zachowuje strukturę długich łańcuchów [Benyounes i Benmounah, 2012; Mitsumata i in., 2003]. Obserwowano szybsze uwalnianie z emulsji E2 o mniejszych rozmiarach kropeł, w porównaniu z emulsją E1, co wynika z ich większej powierzchni międzyfazowej.

Wnioski

Wyniki pracy potwierdziły możliwość realizacji selektywnego transportu składnika w układach wielofazowych jako emulsyjnych nośnikach chemoterapeutyku do zastosowań w terapiach guzów nowotworowych.

Dzięki zastosowaniu jako składnika emulsji biopolimeru (sól sodowa karboxymetylocelulozy) odpowiadającego zmianą swoich właściwości fizykochemicznych (lepkości) na zmiany zewnętrznych parametrów (*pH* środowiska) uzyskano nośnik pozwalający na selektywne uwalnianie enkapsulowanego chemoterapeutyku (chlorowodoru doksorubicyny).

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
- Cardone R. A., Casavola V., Reshkin S. J. (2004). The role of disturbed *pH* dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 5(10), 786-795. DOI: 10.1038/nrc1713
- Vaupel P. (2004). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. In *Semin. Radiat. Oncol.*, 14(3), 198-206. DOI: 10.1016/j.semradonc.2004.04.008
- Dłuska E., Markowska-Radomska A., (2010). Regimes of multiple emulsions of W1/O/W2 and O1/W/O2 type in the continuous Couette-Taylor flow contactor, *Chem. Eng. Technol.*, 33(1), 113-120. DOI: 10.1002/ceat.200900278
- Dłuska E., Markowska-Radomska A., Metera A., Tudek B., and Kosicki K., (2017) Multiple emulsions as effective platforms for controlled anti-cancer drug delivery, *Nanomedicine*, 12, 2183-2197. DOI: 10.2217/nmm-2017-0112
- Benyounes K., Benmounah A., (2012). Rheological and electrokinetic properties of carboxymethylcellulose-water dispersions in the presence of salts, *Int. J. Phys. Sci.*, 7(11), 1790 – 1798. DOI: 10.5897/IJPS11.1779
- Mitsumata T., Suemitsu Y., Fujii K., Fujii T., Taniguchi T., Koyama K., (2003), *pH*-response of chitosan, κ -carrageenan, carboxymethyl cellulose sodium salt complex hydrogels. *Polymer*, 44(23), 7103-7111. DOI: 10.1016/j.polymer.2003.09.001

Praca była finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki nr 2014/13/B/ST8/04274