

Микроскопическое и спектральное исследование кинетики высвобождения бетаметазона дипропионата из контейнеров-носителей в водных средах

© Ю.И. Свенская¹, П.А. Демина¹, М.С. Савельева¹, Е.С. Прихожденко², П.С. Пиденко³, С.Н. Штыков³

¹ Научный медицинский центр, Саратовский национальный исследовательский государственный университет, 410012 Саратов, Россия

² Институт физики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет, 410012 Саратов, Россия

³ Институт химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет, 410012 Саратов, Россия

e-mail: svenskaya@info.sgu.ru

Поступила в редакцию 15.12.2023 г.

В окончательной редакции 26.02.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Разработка новых систем доставки водонерастворимых глюкокортикостероидов (ГКС) к месту протекания воспалительного процесса в кожном покрове является основой повышения эффективности их терапевтического действия. Особый интерес в этом контексте представляют контейнеры-носители для инкапсуляции ГКС, которые позволяют увеличивать локальную концентрацию препарата в зоне патологии и вследствие этого уменьшать дозу препарата и его токсическое действие на организм. Для решения данной задачи в качестве контейнеров предложено использовать пористые метастабильные субмикронные частицы ватерита, отличающиеся высокой сорбционной емкостью и способные высвобождать иммобилизованное вещество в процессе своей деградации. Возможность эффективной загрузки таких контейнеров водонерастворимыми ГКС показана на примере бетаметазона дипропионата (БД). Комплексная оценка его иммобилизации состояла в сочетании различных спектроскопических методов с данными электронной микроскопии. Кроме того, оптимизирована методика изучения кинетики высвобождения БД в модельных водных средах *in vitro*. Введение неионного поверхностно-активного вещества в качестве солюбилизатора к водной суспензии контейнеров, нагруженных БД, обеспечило повышение точности спектроскопического определения концентрации препарата, высвобождающегося в разные промежутки времени. Показана корреляция данных, полученных при исследовании кинетики высвобождения препарата данным способом, с результатами мониторинга состояния контейнеров методами сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния, УФ спектрофотометрия, сканирующая электронная микроскопия, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, глюкокортикостероиды, инкапсулирование, ватерит, адресная доставка лекарств.

DOI: 10.61011/OS.2024.03.58146.30-24

Введение

Глюкокортикостероиды (ГКС) являются важной составляющей терапии широкого спектра воспалительных заболеваний, в том числе дерматозов различной природы [1–3]. Однако нерациональное использование ГКС, состоящее в длительном или неконтролируемом применении, увеличении дозы и необоснованном повышении класса используемого стероида, вызывает множество побочных эффектов, вплоть до обострения хронических заболеваний и развития вторичных инфекций [4]. В этой связи актуальной задачей является разработка подходов, обеспечивающих эффективное применение существующих ГКС-препаратов. Увеличение их локальной концентрации и вероятности аккумуляции в коже и ее придатках может внести важный вклад в улучшение терапевтической эффективности топических глюкокортикоидов.

Перспективным путем повышения локальной биодоступности ГКС считается использование различных систем их адресной доставки [5]. В последние десятилетия большое распространение получил подход, основанный на иммобилизации ГКС в различные наноразмерные и субмикронные контейнеры: липосомы, ниосомы, этосомы, мицеллы, наноэмульсии, а также полимерные, композитные или неорганические частицы [6,7]. Применение таких контейнеров-носителей позволяет существенно повысить эффективность переноса препаратов через роговой слой при нанесении на кожу. Их важной особенностью является возможность управления профилем высвобождения иммобилизованного вещества.

В этой связи большой интерес для иммобилизации ГКС вызывает применение пористых субмикронных частиц карбоната кальция (CaCO_3) в форме ватерита, которые легко синтезируются и имеют низкую себестоимость [8]. Высокая пористость частиц ватерита служит

основой эффективного захвата в их объем широкого спектра биологически активных веществ, т.е. высокой сорбционной емкости по отношению к сорбату [8–10]. Возможность использования ватеритных контейнеров для инкапсуляции лекарств обусловлена также их биосовместимостью [11–13] и биodeградируемостью [14,15]. Кроме того, многократно показано, что в процессе деградации такие частицы постепенно высвобождают заключенное вещество как *in vitro* [16–18], так и *in vivo* [14,19–21].

В настоящей работе исследована возможность иммобилизации ГКС бетаметазона дипропионата (БД) в контейнеры на основе частиц ватерита. Структурная формула БД представлена на рис. 1, а. Данный препарат относится к ГКС первого класса активности (препараты максимальной силы действия) и способен оказывать быстрый терапевтический эффект при лечении воспалительных дерматозов неинфекционной природы [22]. Эффективность иммобилизации БД в частицы ватерита оценивали методами УФ спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а также спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). Процесс высвобождения БД из контейнеров в модельных водных средах изучали комплексом методов, сочетая УФ и энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию (ЭДС) со сканирующей электронной микроскопией (СЭМ). Одновременно с целью улучшения достоверности определения БД оценивали влияние полярного растворителя, а также неионного поверхностно-активного вещества (НПАВ) на растворимость препарата в водной суспензии контейнеров.

Материалы и методы

Материалы

В исследовании использовали дигидрат хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), карбонат натрия (Na_2CO_3), этиленгликоль (ЭГ), бетаметазона дипропионат (betamethasonedipropionate, БД), полисорбат 20 (Tween 20) (все Sigma-Aldrich, США), этанол 96% и соляную кислоту (HCl), (ЭкоХимАналит, Россия), ацетонитрил осч (Криохром, Россия), а также фосфатно-солевой буфер Дульбекко без добавления кальция и магния DPBS (Gibco, США). Все химические реактивы использовали без дополнительной очистки. На всех стадиях исследования применяли деионизованную воду, полученную на системе очистки воды Milli-Q (США). Используемый в работе этанол имел концентрацию 96%, если не указано иное.

Синтез ватеритных контейнеров-носителей, содержащих БД

На первом этапе в смеси воды и ЭГ синтезировали ненагруженные частицы ватерита [17]. Для этого одинаковые объемы 1 М растворов CaCl_2 и Na_2CO_3 смешивали с ЭГ в соотношении 1:5, а затем смешивали между

собой при постоянном перемешивании на магнитной мешалке ИКА RO 10 (ИКА, Германия) со скоростью 700 rpm в течение 2.5 h при комнатной температуре. Твердую фазу (частицы CaCO_3) отделяли от маточного раствора на центрифуге Eppendorf 5810 R (Eppendorf, Германия) при скорости вращения 5000 rpm в течение 10 min. Для удаления остатков ЭГ и неорганических ионов осадок промывали дважды деионизованной водой и водным раствором этанола 70%. Полученные частицы лиофильно высушивали при температуре -50°C в течение 2 h, используя установку FreeZone (Labconco, США).

Иммобилизацию БД в полученные контейнеры проводили методом индуцированной кристаллизации с одно-временной адсорбцией [23]. Для этого к навеске частиц ватерита массой 40 mg добавляли 0.5 mL раствора БД (2 mg/mL) в этаноле и разбавляли водой до 2 mL. Концентрация этанола в результирующей смеси составляла 24%. Полученную суспензию частиц ватерита тщательно перемешивали с помощью вортекса ELMi V-3 (ELMI, Латвия), а затем на ротационном смесителе (TetraQuant, Россия) и помещали в морозильную камеру при -20°C . После полного замораживания суспензии образцы оттаивали при комнатной температуре. Затем твердую фазу (частицы $\text{CaCO}_3 + \text{БД}$) отделяли при помощи центрифуги Eppendorf 5430 (Eppendorf, Германия), супернатант отбирали для спектрофотометрического определения концентрации БД, а к осадку частиц вновь приливали раствор БД, полностью повторяя цикл замораживание/оттаивание/отбор супернатанта. После этого контейнеры вновь лиофильно высушивали в течение 8 h.

Морфологию полученных CaCO_3 и контейнеров $\text{CaCO}_3 + \text{БД}$ исследовали методом СЭМ на установке MIRA II LMU (Tescan, Чехия) при рабочем напряжении 20 kV. По полученным СЭМ-изображениям при помощи программы ImageJ рассчитывали средний размер контейнеров при выборке не менее 200 частиц.

Спектральное исследование эффективности иммобилизации БД в контейнеры

Содержание БД в контейнерах оценивали, применяя методы спектрофотометрии в УФ области и ВЭЖХ с фотометрическим детектором. Спектрофотометрическое исследование выполняли в двух вариантах. В первом варианте для оценки количества иммобилизованного БД определяли остаточную концентрацию БД в супернатанте и по разности с его исходным содержанием рассчитывали количество сорбированного ватеритом препарата. Оптическую плотность растворов измеряли в стандартной кварцевой кювете $l = 1 \text{ cm}$ на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония), градуировочный график получали в смеси этанол-вода в соотношении 1:4 (24%-ный этанол). Максимум спектра поглощения БД в 24%-ном этаноле находился на длине волны 239 nm (рис. 2, а). При построении этого и последующих градуировочных графиков вычитание базовой линии из

спектров оптической плотности растворов БД не проводили.

Во втором варианте оценивали эффективность высвобождения БД из контейнеров после их растворения. Оптическую плотность раствора измеряли на планшетном многофункциональном анализаторе CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия). Для полного высвобождения иммобилизованного ГКС частицы CaCO_3 +БД растворяли добавлением соляной кислоты по реакции



Для этого к навеске контейнеров по каплям добавляли 0.2 М HCl и тщательно перемешивали вплоть до полного растворения фазы CaCO_3 , затем добавляли этанол и снова перемешивали до полного растворения высвободившегося БД. Соотношение 0.2 М HCl/этанол в результирующей смеси составляло 1:4. Полученный этанольный раствор содержал БД и ионы Ca^{2+} и Cl^- . Для построения градуировочного графика в данном случае навеску ненагруженных ватеритных контейнеров растворяли аналогичным образом, а затем в полученной смеси растворяли известную навеску порошка БД. Максимум спектра поглощения БД в данной смеси находился на длине волны 242 nm.

Исследование методом ВЭЖХ супернатантов, собранных для анализа в процессе синтеза контейнеров CaCO_3 +БД, выполняли с помощью хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония). При измерении использовали колонку Spherisorb ODS2 C18 Column, 80 Å, 5 µm, 4.6 × 250 mm, в качестве подвижных фаз использовали ацетонитрил (подвижная фаза А) и деионизованную воду (подвижная фаза В) в соотношении 52/48 (А/В). Детектирование осуществляли на длине волны 254 nm. Характерный хроматографический пик БД наблюдали при времени удерживания 12 min 13 s (рис. 3, а).

Эффективность загрузки контейнеров препаратом БД рассчитывали (емкость загрузки полученных контейнеров, loading capacity, %LC) согласно формуле

$$\%LC = \frac{m_{\text{БДin(CaCO}_3\text{+БД)}}}{m_{\text{(CaCO}_3\text{+БД)}}} \times 100, \quad (1)$$

где $m_{\text{(CaCO}_3\text{+БД)}}$ — масса навески контейнеров, $m_{\text{БДin(CaCO}_3\text{+БД)}}$ — масса БД в полученных контейнерах.

Для подтверждения факта иммобилизации БД в контейнеры ватерита также применяли метод спектроскопии КР. Для измерения использовали спектрометр Renishaw InVia (Renishaw, Великобритания) с длиной волны лазерного возбуждения 532 nm и объективом 50 × /0.5 н.а. Раздельно получали спектры КР сухих навесок порошков CaCO_3 и контейнеров CaCO_3 +БД, а также самого БД. Для каждого образца спектры КР регистрировали в нескольких точках при мощности лазера 2.5 mW, время регистрации составляло 10 s. Погрешность положения пика была менее 0.1 cm^{-1} (калибровку системы перед измерениями проводили после лазерной

термостабилизации с использованием эталонного образца кремния).

Для количественной оценки содержания БД в исследуемых образцах методом спектроскопии КР строили градуировочный график, измеряя спектры раствора БД в этаноле в диапазоне концентраций БД 0.0625–1.0000 mg/mL. Перед измерением каплю исследуемого раствора объемом 20 µL равномерно распределяли по поверхности кварцевой подложки и дожидались высыхания. Исследование проводили при мощности лазера 12.5 mW, время регистрации составляло 30 s. Идентификацию химического состава объектов проводили в матрице точек 7 × 7 с шагом 20 µm. Для каждого образца получали 49 одиночных спектров КР, по которым далее рассчитывали средний сигнал по образцу. Градуировочный график строили по значениям интенсивности сигнала КР в пике с волновым числом 1660 cm^{-1} , соответствующем БД. Аналогичные измерения проводили для супернатантов, собранных в процессе синтеза контейнеров CaCO_3 +БД, которые предварительно концентрировали в 10 раз. С этой целью 0.5 mL исследуемого супернатанта лиофилизировали, а затем искомую навеску БД ресуспендировали в 50 µL этанола.

Кинетика высвобождения БД из ватеритных контейнеров в воде

На первом этапе исследование процесса высвобождения БД из полученных контейнеров проводили в деионизованной воде. К навескам частиц CaCO_3 +БД массой 4 mg добавляли 1 mL воды, после чего образцы помещали в шейкер Digital Shaking Drybath (Terumo Scientific, США) при комнатной температуре и инкубировали при непрерывном встряхивании в течение 96 h. Для каждой временной точки (5 min, 24, 48, 72 и 96 h инкубации) готовили по 3 отдельные пробирки с навеской частиц.

Состояние контейнеров во времени оценивали по данным морфологического исследования методом СЭМ, отбирая на анализ 1 µL суспензии в каждый конкретный момент времени. Профили высвобождения БД исследовали методом УФ спектрофотометрии. Для растворения кристаллов БД, высвободившегося в определенный момент времени, к суспензии контейнеров CaCO_3 +БД непосредственно перед измерением спектров поглощения добавляли 1 mL полярного протонодонорного растворителя (этанола) и тщательно перемешивали [24]. Затем образцы центрифугировали в течение 2 min при 5000 rpm и супернатанты отбирали на спектрофотометрический анализ. Для построения градуировочного графика навеску порошка БД в данном случае растворяли в смеси этанол-вода при соотношении 1:1.

Кинетика высвобождения БД из ватеритных контейнеров в смеси этанол-вода

На следующем этапе профиль высвобождения БД из контейнеров сразу исследовали в смеси этанол-вода

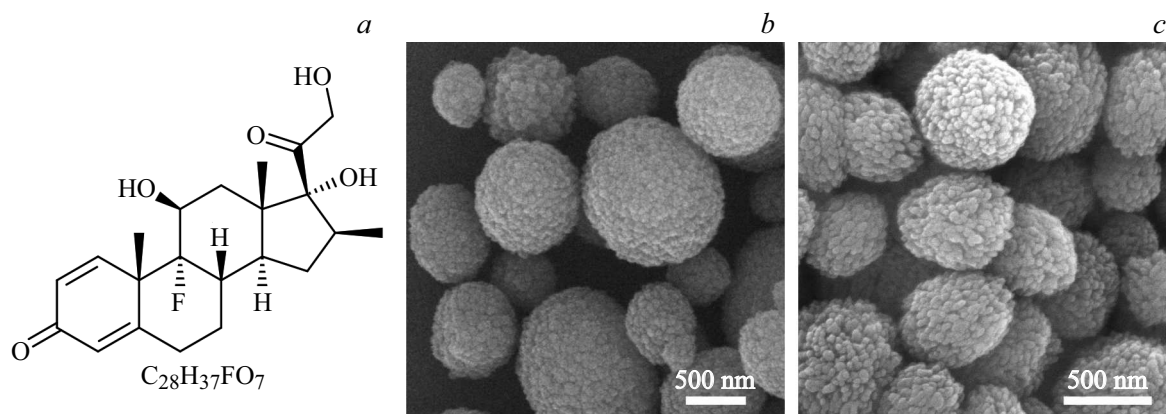


Рис. 1. Структурная формула БД (а). СЭМ-изображения ненагруженных (b) и нагруженных БД (c) контейнеров CaCO_3 .

(1:1). Для этого навеску частиц CaCO_3 +БД массой 20 mg помещали в смесь этанол-вода объемом 20 mL и инкубировали при комнатной температуре при непрерывном перемешивании на шейкере в течение 72 h. Через различные временные промежутки (5 min, 24, 48 и 72 h инкубации) отбирали 2 mL исследуемой суспензии. После центрифугирования отобранных образцов осадок анализировали методом СЭМ, а супернатанты анализировали методом УФ спектрофотометрии.

Кинетика высвобождения БД из ватеритных контейнеров в смеси DBPS-Tween 20

На финальном этапе исследование кинетики высвобождения БД из контейнеров проводили в DPBS с добавлением НПАВ Tween 20. Для инкубации использовали диализный мешок с диаметром пор 14 kDa, в который помещали навеску частиц CaCO_3 +БД массой 40 mg и добавляли 5 mL смеси DPBS-Tween 20 (0.1%). Образец инкубировали в течение 144 h в 40 mL смеси DPBS-Tween 20 при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке с подогревом до 37°C. Для определения оптической плотности раствора отбирали аликвоты через 5 и 30 min, 1, 6, 24 и 144 h. Через 144 h суспензию контейнеров исследовали методами СЭМ и ЭДС с помощью спектрометра Inca Energy 350 (Oxford Instruments, Великобритания).

Результаты и обсуждение

Иммобилизация БД в ватеритные контейнеры

Ватеритные контейнеры-носители синтезировали кристаллизацией из раствора при сливании солей хлорида кальция и карбоната натрия [25]. Известно, что при таком синтезе аморфный осадок CaCO_3 , образующийся при быстром смешивании растворов указанных солей, в результате коллоидной агрегации переходит в упорядоченные сферолиты. Варьируя условия проведения

процесса, можно получать сферолиты различного размера от 0.4 до 50 μm [26,27]. Наше исследование было нацелено на получение субмикронных контейнеров как оптимальных по размеру с точки зрения накопления в придатках кожи [14]. Синтез проводили в вязкой водно-этиленгликолевой среде [26,28], что обеспечило формирование пористых сферических частиц CaCO_3 , средний размер которых составил $0.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (рис. 1, b).

Полученные контейнеры нагружали водонерастворимым БД, используя адсорбцию, индуцированную кристаллизацией. Данный метод предполагает включение органических молекул в частицы ватерита в водной среде при контролируемом замораживании их суспензии. При этом загрузка активного вещества в поры ватерита происходит под действием движения фронта кристаллизации раствора [23]. Такой метод позволяет осуществлять загрузку активного вещества из водно-спиртовой смеси при достижении полного замораживания суспензии. В нашем исследовании иммобилизацию БД в ватеритные контейнеры проводили из 24%-го этанола. СЭМ-изображение полученных контейнеров представлено на рис. 1, c.

Согласно данным УФ спектрофотометрии, содержание БД в 1 mg контейнеров составило $49 \pm 6 \mu\text{g}$ (%LC = 4.9% w/w), что существенно превосходит содержание действующего вещества в классических лекарственных формах (кремах, эмульсиях и мазях, например, Белодерм и Акридерм), заключающих в себе 0.05% БД, и открывает перспективы повышения эффективности применения данного ГКС. Важно отметить, что емкость загрузки, оцененная в разных вариантах, т.е. по результатам анализа супернатанта при синтезе и при варьировании контейнеров, совпала, что характеризует оба варианта как равноценные.

Спектры поглощения растворов БД различной концентрации в 24%-ном этаноле, а также градуировочный график для его определения спектрофотометрическим методом представлены на рис. 2.

По данным ВЭЖХ установлено, что 1 mg контейнеров содержит $48 \pm 3 \mu\text{g}$ БД, что укладывается в рамки по-

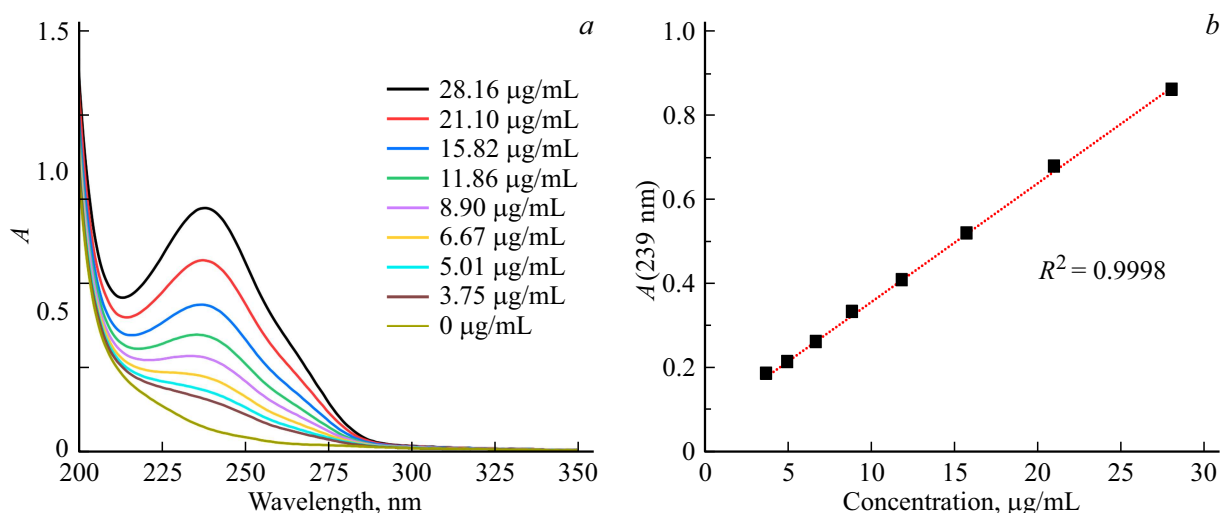


Рис. 2. Спектры поглощения растворов БД различной концентрации в 24%-ном этаноле (а) и градуировочный график для определения БД в контейнерах спектрофотометрическим методом (b).

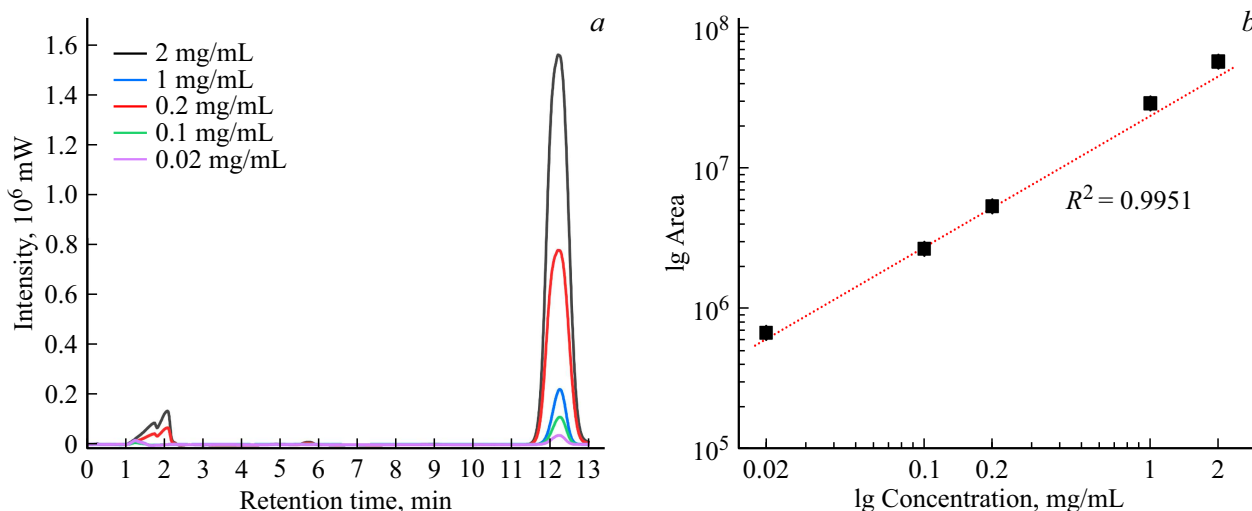


Рис. 3. Хроматограммы растворов БД различной концентрации (а) и построенный по ним градуировочный график (b). Время удерживания БД составляло 12 min 13 s.

грешности спектрофотометрического определения концентрации БД. Хроматограммы растворов БД различной концентрации и градуировочный график представлены на рис. 3.

Для подтверждения факта включения БД в ватеритную матрицу также исследовали спектры КР полученных контейнеров (рис. 4, а). Наличие пиков ватерита (1075 и 1089 cm^{-1}) [29] и глюкокортикоида (1660 cm^{-1} на вставке рис. 4, а) [30,31] в полученных спектрах контейнеров CaCO_3 +БД свидетельствовало о присутствии препарата в матрице ватерита.

Спектроскопию КР также применяли для количественной оценки содержания БД в растворах. С этой целью предварительно строили градуировочный график, используя средние значения интенсивностей сигнала КР в пике с волновым числом 1660 cm^{-1} для растворов

БД в диапазоне концентраций $0.0625\text{--}1.0000\text{ mg/mL}$ (рис. 4, b). При аппроксимации полученных точек линейной функцией коэффициент детерминации R^2 составил 0.984 , т.е. метод спектроскопии КР в целом применим для определения БД, однако большой разброс значений интенсивности сигнала КР в каждой точке говорит о несколько худшей воспроизводимости результатов по сравнению со спектрофотометрическим методом.

Использование спектроскопии КР для исследования одного из супернатантов, собранного при синтезе контейнеров CaCO_3 +БД и сконцентрированного перед измерением в 10 раз, позволило установить, что концентрация БД в концентрате составляет $0.22 \pm 0.03\text{ mg/mL}$, т.е. в исходном растворе она равна 0.022 mg/mL . В целом это соответствует данным спектрофотометрическо-

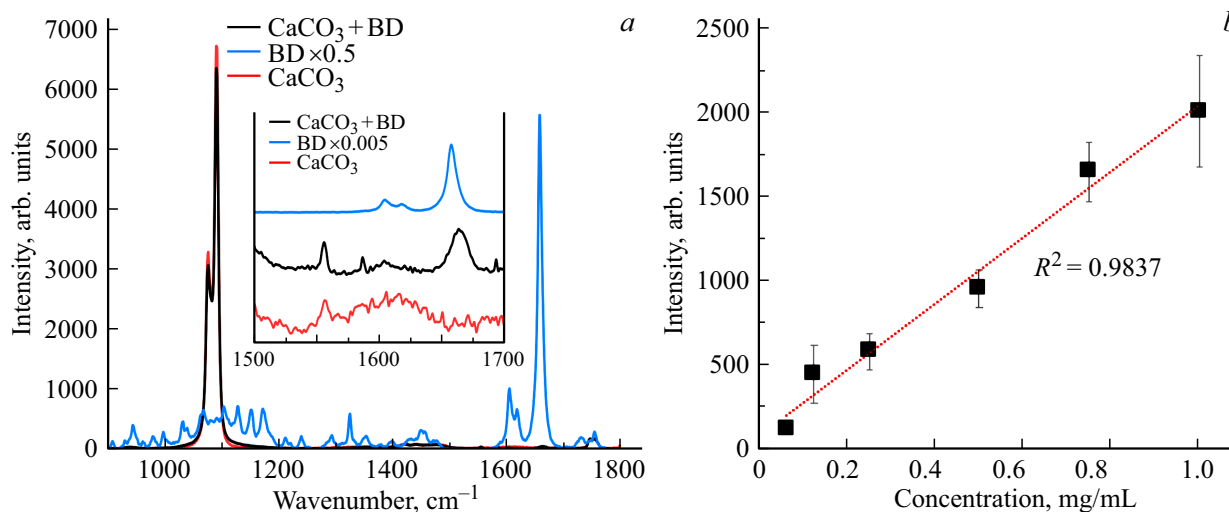


Рис. 4. Спектры КР контейнеров, нагруженных БД, (черная кривая, $\text{CaCO}_3 + \text{BD}$) в сравнении с ненагруженными частицами ватерита (красная кривая, CaCO_3) и порошком БД (синяя кривая, BD) (а). Градуировочный график для определения БД в этаноле методом спектроскопии КР в пике с волновым числом 1660 cm^{-1} . Значения на графике представляют собой „среднее \pm стандартное отклонение“, рассчитанные на основе 49 независимых измерений для каждой точки (б).

го анализа (0.018 mg/mL), однако подтверждает, что погрешность определения при использовании спектроскопии КР более высокая (средние значения различаются на 22%), что обусловлено меньшей чувствительностью данного метода. Эти результаты позволили нам выбрать спектрофотометрический метод для дальнейшего исследования кинетики высвобождения препарата из контейнеров $\text{CaCO}_3 + \text{BD}$ в водных средах.

Исследование процесса высвобождения БД из контейнеров в водных средах

Высвобождение иммобилизованного препарата из пористых контейнеров CaCO_3 и переход в водную фазу происходят в результате его десорбции, а также в процессе деградации контейнеров [10]. Таким образом, профиль высвобождения представляет собой взаимодействие этих двух процессов и зависит от дисперсионной среды [17]. В частности, если растворитель не способен эффективно переводить иммобилизованное вещество в молекулярно-дисперсное состояние, то процесс десорбции протекает медленно. Напротив, этот процесс интенсифицируется, если среда представляет собой подходящий растворитель, который, проникая в ватеритную матрицу, растворяет содержащийся в ее объеме препарат, гарантируя его быструю диффузию в среде. Помимо этого, известно, что ватерит, будучи метастабильной формой карбоната кальция, перекристаллизуется в термодинамически стабильный кальцит в водной среде [32,33]. От скорости данного процесса также зависит скорость высвобождения иммобилизованного вещества. Высвободившийся препарат может либо переходить в растворитель, либо выпадать в осадок, если его растворимость в данной среде ограничена [10].

Важным этапом исследования систем адресной доставки лекарств является моделирование их поведения в физиологических условиях, в том числе при изучении кинетики высвобождения лекарственных препаратов из контейнеров-носителей в водных средах, имитирующих биологические жидкости. В нашем исследовании на первом этапе кинетику высвобождения БД из ватеритных контейнеров изучали в деионизованной воде. Профиль высвобождения препарата приведен на рис. 5, а. На рис. 5, б представлены СЭМ-изображения контейнеров $\text{CaCO}_3 + \text{BD}$, полученные через различные временные промежутки в ходе их инкубации в деионизованной воде.

Бетаметазона дипропионат практически нерастворим в воде и при высвобождении из ватеритных контейнеров образует кристаллический осадок, что искажает данные о его концентрации в исследуемых суспензиях. Это подтверждает кривая кинетики высвобождения БД в воде (рис. 5, а), имеющая достаточно большой разброс значений в каждый определенный момент времени. Результаты исследования контейнеров методом СЭМ позволили проследить структурно-морфологические изменения, происходящие в ходе их инкубации в воде (рис. 5, б). Установлено, что деградация частиц $\text{CaCO}_3 + \text{BD}$ в водной среде продолжалась в течение 96 h. В течение этого времени фаза ватерита полностью замещалась фазой кальцита и пористые сферические контейнеры перекристаллизовывались в гладкие кубические кристаллы. Важно, что через 24 h после начала инкубации основная масса частиц ватерита сохраняла свою исходную морфологию, отмечалось появление только единичных кристаллов кальцита. Через 48 h появлялись кристаллы БД разнообразной формы (призматические, ромбоэдрические и столбчатые), далее размер и число таких кристаллов увеличивались. Необходимо отметить,

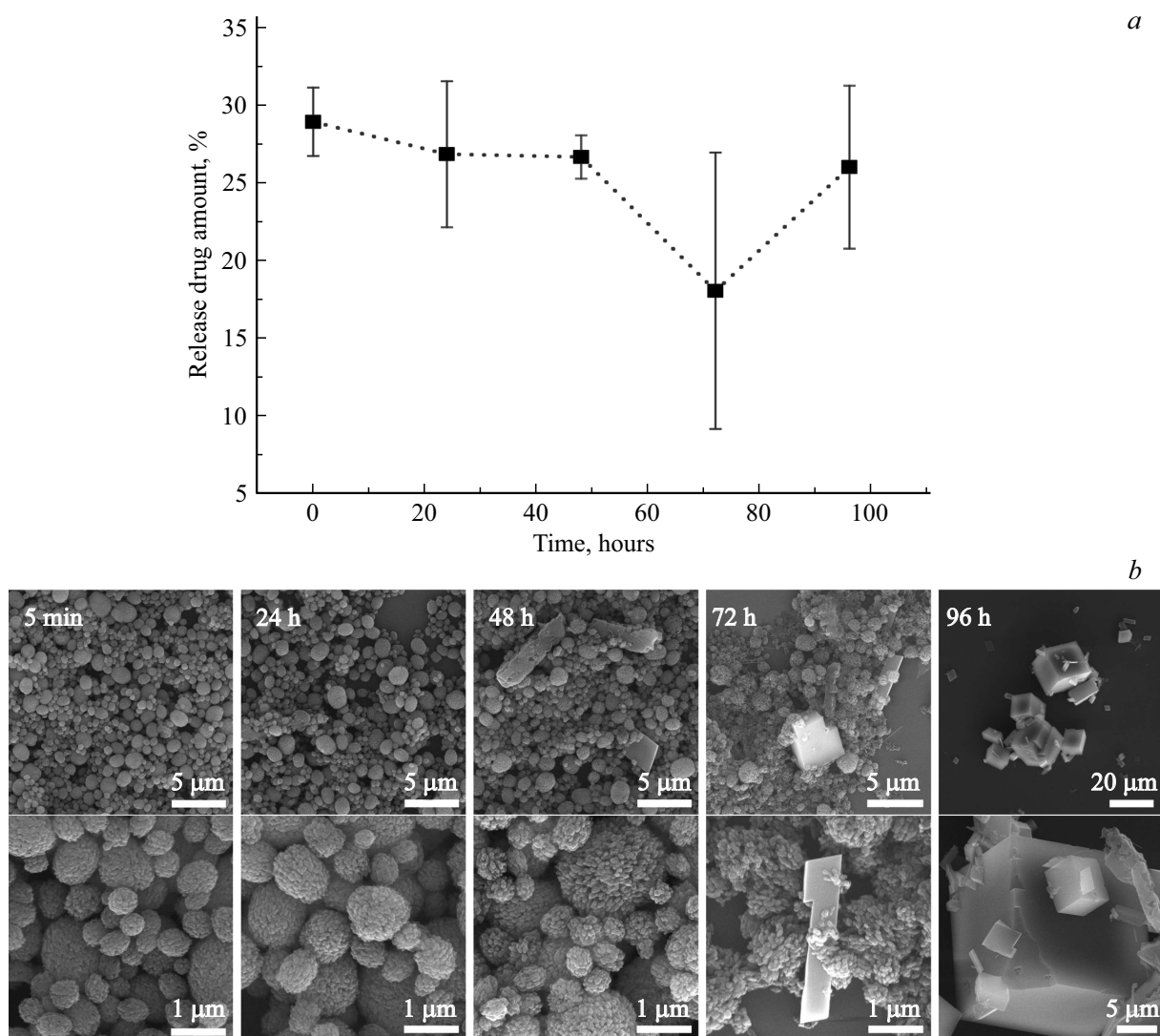


Рис. 5. Кинетика высвобождения БД из контейнеров в деионизованной воде (а). Характерные СЭМ-изображения контейнеров CaCO_3 +БД, полученные через различные промежутки времени в ходе их инкубации в деионизованной воде: 5 min, 24, 48, 72 и 96 h (b).

что через 72 h основной процент контейнеров перешел в аморфное состояние, что сопровождалось высвобождением иммобилизованного БД. Далее из аморфного карбоната кальция формировались частицы кальцита. Как видно из СЭМ-изображений, процесс формирования крупных кристаллов кальцита сопровождался захватом более мелких частиц твердого БД. Совокупность описанных явлений, происходящих во времени, объясняет большой разброс значений и отрицательный наклон кинетической кривой на рис. 5, а.

На следующем этапе исследования процесс высвобождения БД из контейнеров CaCO_3 +БД изучали в смеси этанол-вода (1:1). Выбор такой дисперсионной среды был обусловлен необходимостью предотвратить формирование кристаллов ГКС в процессе его высвобождения и, таким образом, смоделировать протекание

данного процесса в „открытой системе“ [34]. На рис. 6 представлены полученные результаты.

Из рис. 6, а видно, что контейнеры CaCO_3 +БД высвобождали до 80% содержащегося в них препарата в течение 5 min инкубации в смеси этанол-вода (рис. 6, а). Такой быстрый выход БД („взрывное“ высвобождение) обусловлен его более высокой растворимостью в этаноле, который проникает в поры ватерита. При дальнейшей инкубации контейнеров в данном растворителе масса высвобождаемого препарата не увеличивалась, поскольку все доступное иммобилизованное вещество было уже экстрагировано из твердой фазы в первые 5 min, а деградация матрицы, которая бы способствовала высвобождению оставшихся 20% БД, не наблюдалась (рис. 6, b). Контейнеры сохраняли свою исходную морфологию в течение всего периода наблюдения, что хорошо согла-

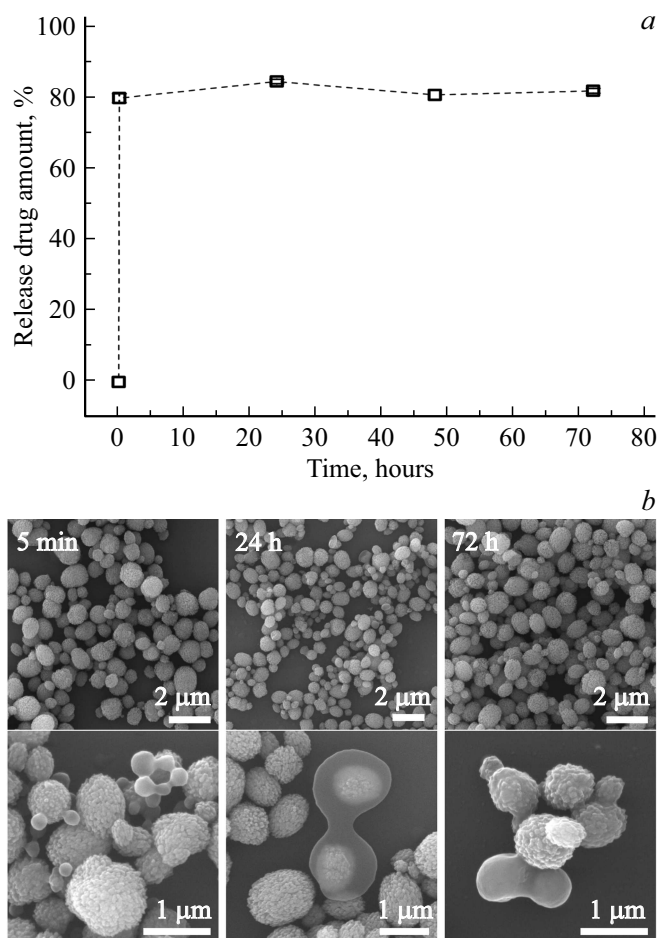


Рис. 6. Кинетика высвобождения БД из контейнеров в смеси этанол-вода (1:1) (а). Характерные СЭМ-изображения контейнеров CaCO_3 +БД, полученные через различные промежутки времени в ходе их инкубации в смеси этанол-вода (1:1): 5 min, 24 и 72 h (b).

судется с литературными данными, свидетельствующими о высокой стабильности ватерита в этаноле [17].

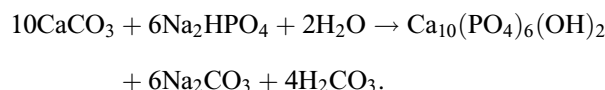
Таким образом, исследование кинетики высвобождения иммобилизованного БД из ватеритных носителей в водно-этанольной смеси явилось некорректным. В данном случае удалось скорее добиться экстракции препарата, содержащегося в контейнерах CaCO_3 +БД, чем смоделировать их поведение в открытой системе.

На заключительном этапе изучение процесса высвобождения БД проводили в водном буферном растворе DPBS с добавлением солилизатора — НПAB, роль которого выполнял Tween 20. Известно, что введение данного ПАВ увеличивает растворимость БД в фосфатном буфере, обеспечивая тем самым возможность моделирования „открытой системы“ для изучаемых носителей [35]. Полученные результаты представлены на рис. 7.

В течение первых 6 h инкубации контейнеров CaCO_3 +БД в смеси DPBS-Tween 20 происходило интенсивное высвобождение препарата (рис. 7, а). За это

время из контейнеров высвободилось 38% массы иммобилизованного БД. Далее угол наклона кинетической кривой уменьшался, однако высвобождение активно продолжалось. По прошествии суток масса вышедшего препарата удвоилась, т.е. за 24 h из контейнеров высвободилось 77% содержащегося в них препарата. Затем кинетическая кривая становилась более пологой и выходила на насыщение. К концу периода инкубации контейнеров в растворе DPBS-Tween 20 (в течение 144 h) из носителей вышло 90% препарата. Оставшиеся 10%, согласно данным СЭМ (рис. 7, b), выпали в осадок, образовав столбчатые кристаллы. Анализ элементного состава данных кристаллов методом ЭДС подтвердил их принадлежность БД, поскольку выявил наличие фтора (рис. 1, а) в спектрах, снятых с соответствующих участков образца (sp 1 на рис. 7, c, d).

Кроме того, СЭМ-изображение, полученное через 144 h инкубации частиц CaCO_3 +БД в DPBS, свидетельствовало о формировании кристаллов гидроксиапатита в образце (сферические частицы с игольчатой поверхностью на рис. 7, b), что хорошо согласуется с литературными данными, свидетельствующими о преобразовании ватеритных контейнеров в частицы гидроксиапатита при инкубации в фосфатно-солевом буфере [36]. Исследование элементного состава сформированных структур с помощью ЭДС подтвердило наличие характерных для гидроксиапатита атомов кальция, фосфора и кислорода в образцах (sp 2 и sp 3 на рис. 7, c). Образование частиц гидроксиапатита предположительно происходило согласно следующей обменной реакции [37]:



Таким образом, установлено, что ватеритные контейнеры с БД относительно стабильны в смеси DPBS-Tween 20 в течение часа. Впоследствии отмечается интенсификация процесса высвобождения иммобилизованного препарата и в течение суток 77% загруженного БД выходит в раствор. Соответственно, несмотря на высокую пористость контейнеров ватерита, высвобождение препарата из них не являлось „взрывным“. Профиль высвобождения БД из контейнеров CaCO_3 +БД можно отнести к профилям „устойчивого высвобождения“.

Выводы

На примере БД продемонстрирована возможность загрузки субмикронных частиц ватерита водонерастворимыми ГКС. Спектроскопическими методами проведена оценка эффективности процесса иммобилизации. Установлено, что содержание БД в полученных носителях составило 4.9 % w/w, что существенно превзошло содержание действующего вещества в классических лекарственных формах (0.05 % w/w). В ходе

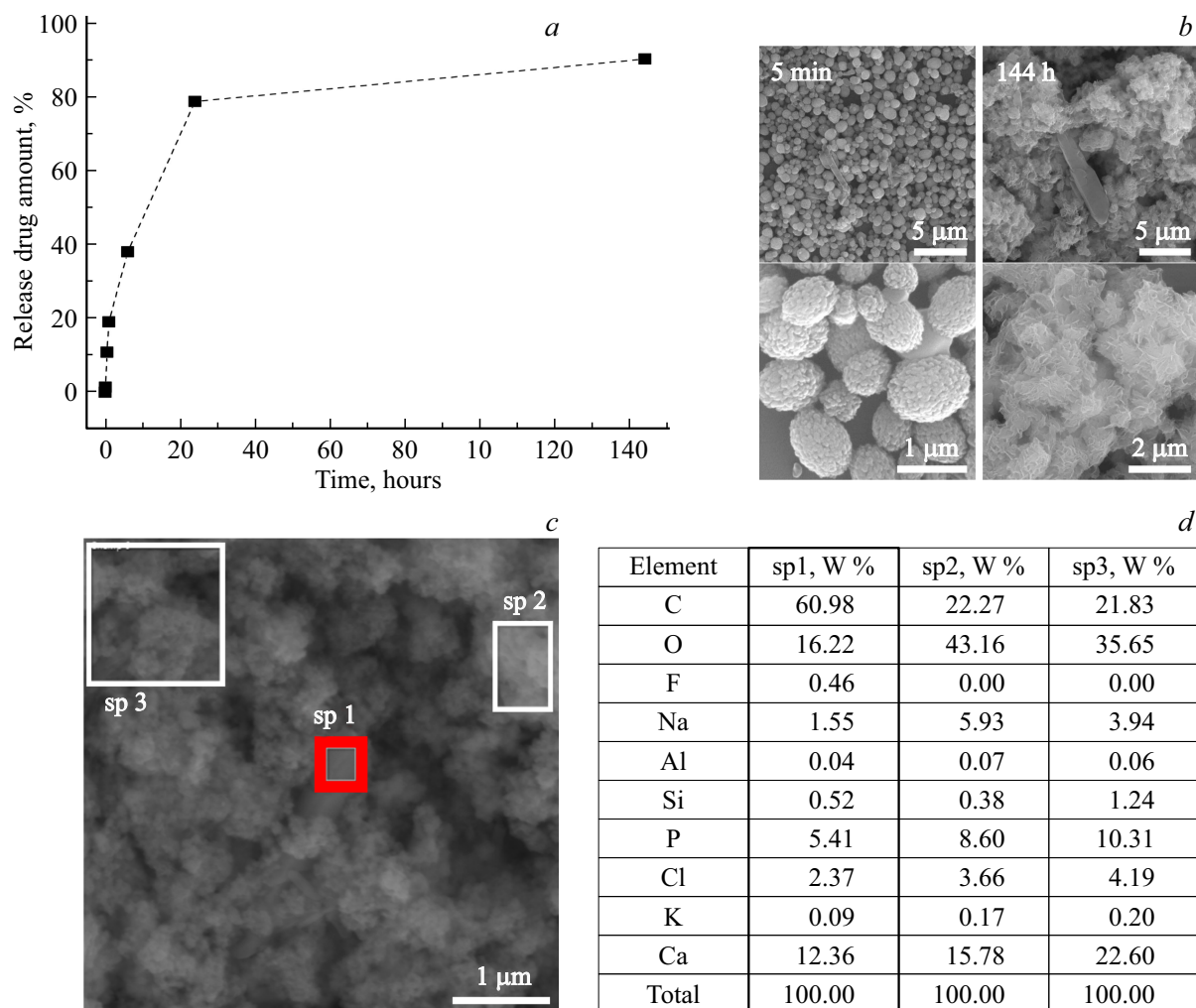


Рис. 7. Кинетика высвобождения БД из контейнеров в смеси DPBS-Tween 20 (a). Характерные СЭМ-изображения контейнеров CaCO₃+БД, полученные через 5 min и 144 h в ходе их инкубации в смеси DPBS-Tween 20 (b). Данные ЭДС, полученные через 144 h инкубации контейнеров в смеси DPBS-Tween 20 (c): исследуемые области отмечены квадратами на СЭМ-изображении, элементный состав образца (W%), соответствующий исследуемым областям, приведен в таблице (d).

исследования разработаны протоколы спектрофотометрической оценки концентрации БД в растворах, применение которых обеспечивает хорошее согласование с данными независимого метода ВЭЖХ и при этом значительно превосходит хроматографический метод по простоте. Проведено комплексное исследование процесса высвобождения нерастворимого в воде препарата БД из полученных контейнеров в модельных водных средах с использованием УФ и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии совместно со сканирующей электронной микроскопией. Продемонстрирована корреляция данных, полученных разными методами. При сравнении полярного растворителя и неионного ПАВ, добавляемых к суспензии контейнеров, показано, что применение ПАВ эффективно, поскольку позволяет повысить растворимость БД в водных средах и обеспечить возможность моделирования поведения нагруженных им частиц ватерита в открытой системе. По результатам

исследования кинетики высвобождения БД в фосфатном буфере полученные контейнеры CaCO₃+БД были отнесены к системам доставки лекарств с профилем устойчивого высвобождения, что позволяет рассматривать их как перспективную альтернативу существующим фармацевтическим формам.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Галушке Виктору Владимировичу за помощь в проведении измерений методами сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

Финансирование работы

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-73-10194).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Клинические рекомендации. Атопический дерматит. 2021. [Электронный ресурс]. URL: <https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/265> (Дата обращения: 24.01.2024)
- [2] Клинические рекомендации. Псориаз. 2023. [Электронный ресурс]. URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/234_2
- [3] Клинические рекомендации. Экзема. [Электронный ресурс]. URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/246_2
- [4] T.A. Belousova, M.V. Goryachkina. *Vestn. Dermatol. Venerol.*, **86** (6), 93 (2010).
- [5] A.L. Bakulev, A.N. Platonova. *Vestn. Dermatol. Venerol.*, **86** (3), 67 (2010). DOI: 10.25208/vdv844
- [6] K. Shetty, A.P. Sherje. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **32** (8), 88 (2021). DOI: 10.1007/s10856-021-06558-y
- [7] C. Almeida, P. Filipe, C. Rosado, C. Pereira-Leite. *Nanomaterials*, **12** (2), 275 (2022). DOI: 10.3390/nano12020275
- [8] D.V. Volodkin, A.I. Petrov, M. Prevot, G.B. Sukhorukov. *Langmuir*, **20** (8), 3398 (2004). DOI: 10.1021/la036177z
- [9] J. Campbell, G. Kastania, D. Volodkin. *Micromachines*, **11** (8), 717 (2020). DOI: 10.3390/mi11080717
- [10] Y. Svenskaya, T. Pallaeva. *Pharmaceutics*, **15** (11), 2574 (2023). DOI: 10.3390/pharmaceutics15112574
- [11] B.V. Parakhonskiy, C. Foss, E. Carletti, M. Fedel, A. Haase, A. Motta, C. Migliaresi, R. Antolini. *Biomater. Sci.*, **1** (12), 1273 (2013). DOI: 10.1039/c3bm60141b
- [12] R.A. Verkhovskii, E.V. Lengert, M.S. Saveleva, A.A. Kozlova, V.V. Tuchin, Y.I. Svenskaya. *Opt. Spectrosc.*, **128** (6), 799 (2020). DOI: 10.1134/S0030400X20060235
- [13] R.A. Verkhovskii, A.A. Kozlova, E.V. Lengert, M.S. Saveleva, M.A. Makarkin, A.M. Mylnikov, N.A. Navolokin, A.B. Bucharskaya, G.S. Terentyuk, I.A. Bosak, N.V. Vasilyeva, Y.I. Svenskaya. *ACS Infect. Dis.*, **9** (5), 1137 (2023). DOI: 10.1021/acinfeddis.3c00084
- [14] Y.I. Svenskaya, E.A. Genina, B.V. Parakhonskiy, E.V. Lengert, E.E. Talnikova, G.S. Terentyuk, S.R. Utz, D.A. Gorin, V.V. Tuchin, G.B. Sukhorukov. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **11** (19), 17270 (2019). DOI: 10.1021/acsami.9b04305
- [15] O. Gusliakova, R. Verkhovskii, A. Abalymov, E. Lengert, A. Kozlova, V. Atkin, O. Nechaeva, A. Morrison, V. Tuchin, Y. Svenskaya. *Mater. Sci. Eng. C*, **119**, 111428 (2021). DOI: 10.1016/j.msec.2020.111428
- [16] Y. Svenskaya, B.V. Parakhonskiy, A. Haase, V. Atkin, E. Lukyanets, D.A. Gorin, R. Antolini. *Biophys. Chem.*, **182**, 11 (2013). DOI: 10.1016/j.bpc.2013.07.006
- [17] B.V. Parakhonskiy, A. Haase, R. Antolini. *Angew. Chemie*, **124** (5), 1221 (2012). DOI: 10.1002/ange.201104316
- [18] O.I. Guslyakova, E.V. Lengert, V.S. Atkin, V.V. Tuchin, Yu.I. Svenskaya. *Spectral monitoring for naftifine hydrochloride immobilization into vaterite submicron particles*, *Opt. Spectrosc.*, **126** (5), 620 (2019). DOI: 10.1134/S0030400X19050114
- [19] M.S. Saveleva, E.V. Lengert, R.A. Verkhovskii, A.A. Abalymov, A.M. Pavlov, A.V. Ermakov, E.S. Prikhodzhenko, S.N. Shtykov, Y.I. Svenskaya. *Biomater. Sci.*, **10** (12), 3323 (2022). DOI: 10.1039/D2BM00539E
- [20] Y.I. Svenskaya, E.V. Lengert, Y.V. Tarakanchikova, A.R. Muslimov, M.S. Saveleva, E.A. Genina, I.L. Radchenko, L.A. Stepanova, A.V. Vasin, G.B. Sukhorukov, L.M. Tsybalova. *J. Mater. Chem. B*, **11** (17), 3860 (2023). DOI: 10.1039/D2TB02779H
- [21] Y.I. Svenskaya, E.E. Talnikova, B.V. Parakhonskiy, V.V. Tuchin, G.B. Sukhorukov, D.A. Gorin, S.R. Utz. *Br. J. Dermatol.*, **182** (6), 1479 (2020). DOI: 10.1111/bjd.18800
- [22] B. Brazzini, N. Pimpinelli. *Am. J. Clin. Dermatol.*, **3** (1), 47 (2002). DOI: 10.2165/00128071-200203010-00005
- [23] S.V. German, M.V. Novoselova, D.N. Bratashov, P.A. Demina, V.S. Atkin, D.V. Voronin, B.N. Khlebtsov, B.V. Parakhonskiy, G.B. Sukhorukov, D.A. Gorin. *Sci. Rep.*, **8** (1), 17763 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-35846-x
- [24] М.С. Савельева, Е.В. Ленгерг, А.М. Абрамова, С.Н. Штыков, Ю.И. Свенская. *Опт. и спектр.*, **129** (6), 669–676 (2021). DOI: 10.21883/OS.2021.06.50976.5k-21 [M.S. Saveleva, E.V. Lengert, A.M. Abramova, S.N. Shtykov, Y.I. Svenskaya. *Opt. Spectrosc.*, **129**, 813 (2021). DOI: 10.1134/S0030400X21060126].
- [25] D.V. Volodkin, R. Von Klitzing, H. Möhwald. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **49** (48), 9258 (2010). DOI: 10.1002/anie.201005089
- [26] Y.I. Svenskaya, H. Fattah, O.A. Inozemtseva, A.G. Ivanova, S.N. Shtykov, D.A. Gorin, B.V. Parakhonskiy. *Cryst. Growth Des.*, **18** (1), 331 (2018). DOI: 10.1021/acs.cgd.7b01328
- [27] A. Vikulina, J. Webster, D. Voronin, E. Ivanov, R. Fakhrullin, V. Vinokurov, D. Volodkin. *Mater. Des.*, **197**, 109220 (2021). DOI: 10.1016/j.matdes.2020.109220
- [28] B.V. Parakhonskiy, A. Haase, R. Antolini. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **51** (5), 1195 (2012). DOI: 10.1002/anie.201104316
- [29] U. Wehrmeister, A.L. Soldati, D.E. Jacob, T. Häger, W. Hofmeister. *J. Raman Spectrosc.*, **41** (2), 193 (2010). DOI: 10.1002/jrs.2438
- [30] T. Suzuki, T. Uchino, Y. Miyazaki, Y. Kagawa. *Chem. Pharm. Bull.*, **60** (2), 260 (2012). DOI: 10.1248/cpb.60.260
- [31] I. Iachina, A.H. Eriksson, M. Bertelsen, K. Petersson, J. Jansson, P. Kemp, K.M. Engell, J.R. Brewer, K.T. Nielsen. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **182**, 106371 (2023). DOI: 10.1016/j.ejps.2023.106371
- [32] T. Ogino, T. Suzuki, K. Sawada. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **51** (10), 2757 (1987). DOI: 10.1016/0016-7037(87)90155-4
- [33] D. Kralj, L. Brecević, A.E. Nielsen. *J. Cryst. Growth*, **143** (3–4), 269 (1994). DOI: 10.1016/0022-0248(94)90067-1
- [34] M. Assem, O.M. Khowessah, D. Ghorab. *AAPS PharmSciTech.*, **20** (4), 152 (2019). DOI: 10.1208/s12249-019-1355-6
- [35] M. Pandey, H. Choudhury, T.A.P. Gunasegaran, S.S. Nathan, S. Md, B. Gorain, M. Tripathy, Z. Hussain. *Drug Deliv. Transl. Res.*, **9** (2), 520 (2019). DOI: 10.1007/s13346-018-0480-1
- [36] B.V. Parakhonskiy, Y.I. Svenskaya, A.M. Yashchenok, H.A. Fattah, O.A. Inozemtseva, F. Tessarolo, R. Antolini, D.A. Gorin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **118**, 243 (2014). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.03.053
- [37] M. Yoshimura, P. Sujaridworakun, F. Koh, T. Fujiwara, D. Pongkao, A. Ahniyaz. *Mater. Sci. Eng. C*, **24** (4), 521 (2004). DOI: 10.1016/j.msec.2004.01.005