

**МЕТОД ЗА ЕЛЕКТРОХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВГРАЖДАНЕТО НА
АМФИФИЛНИ ЛЕКАРСТВЕНИ ВЕЩЕСТВА В ЛИПОЗОМИ**

Билиана Тачева, Бояна Първанова, Радостина Георгиева, Мирослав Карабалиев
*Катедра “Медицинска физика, биофизика, рентгенология и радиология”, Медицински
факултет, Тракийски университет, Стара Загора 6000, България*
miroslav.karabaliiev@trakia-uni.bg

Резюме

Вграждането на амфифилното електроактивно лекарствено вещество хлорпромазин (CPZ) е изследвано *in situ* с помощта на метода на цикличната волтамперометрия (CV). Посредством CV се определя концентрацията на електроактивни вещества в изследвания разтвор, обменящи електрони с работния измервателен електрод в процесите на окисление и редукция. При добавяне на липозоми в разтвора голяма част от наличния хлорпромазин се вгражда в липидния им бислой, което се регистрира по намаляването на сигнала от окислението на останалия невграден в липозомите хлорпромазин. Допълнително с помощта на електрохимична импедансна спектроскопия (EIS) е показано, че наличието на липозоми не променя повърхността на електрода и полученият резултат се дължи именно на взаимодействието на лекарственото вещество с липозомите. Проведени са и паралелни експерименти с хидрофилното вещество фери/фероцианид, което не взаимодейства с липозомите и при което съответно няма промяна на CV-сигнала.

Ключови думи: липозоми, хлорпромазин, лекарствени вещества, циклична волтамперометрия

Въведение

Липозомите са моделна мембранна система, която се използва широко за оценка на ефикасността на лекарствата. Обикновено ефективността на лекарственото вещество се измерва чрез определяне на неговия коефициент на разпределение между водна и липидна фаза, който е мярка за количеството на лекарството, което ще влезе във или ще премине през липидната мембрана на биологичната система. Коефициентите на разпределение се оценяват най-често с помощта на изотропна двуфазна система от разтворители от типа октанол-вода (Klopman and Zhu 2005). Няколко изследвания обаче показват, че липозомните моделни мембрани са по-добра алтернатива в сравнение с традиционните методи, използвани за оценка на коефициентите на разпределение, тъй като системите използвани в тези методи не могат да възпроизведат йонните взаимодействия, които могат да възникнат между лекарствата и липидите, особено когато лекарства са заредени. Липозомите в качеството им на моделна мембранна система могат да бъдат направени с различни размери, в това число на наночастици (под 200 nm).

Освен това на липозомите винаги са се възлагали големи надежди като преносители на лекарствени вещества, които да подобрят ефективността, да намалят страничните ефекти, да увеличат времето за циркулация и да предпазят лекарствата от метаболитно разграждане (Allen 1996). Повечето от изследванията са свързани с антитуморни лекарства, антибактериални, фунгицидни и противовъзпалителни лекарствени вещества. Има и няколко одобрени за клинично използване липозомни системи – напр. липозомен doxorubicin, липозомен daunorubicin, amphotericin B (Allen 1996). Друг пример е използването на липозоми като преносители на нитрозоуреята ломустин (CCNU) (Bethune et al. 1999). Изследвано е влиянието на инкорпорирането на CCNU в липозоми върху лекарствения потенциал (potency) против медулобластомни клетки (medulloblastoma cells) и е определена общата системна експозиция на лекарството в плъхове. Установено е, че свързването на CCNU с липозомите може да повиши стабилността на лекарството, потенциалът му, и системната експозиция.

Допълнителни надежди се възлагат и във връзка с възможността повърхността на липозомите да бъде модифицирана с определени лиганди с цел избирателно взаимодействие с даден вид клетки (Çağdaş, Sezer, and Bucak 2014), като разбира се правят и обещаващи конкретни проучвания в тази посока. Например липозоми с doxorubicine са модифицирани с пептидни лиганд p18-4 (WxEAA YQrFL) с цел специфично взаимодействие с клетки от тумор на гърдата (Shahin et al. 2013).

Целта на настоящата работа е да се покаже, че чрез електрохимични методи може да се доказва и проследява вграждането на амфибилни лекарствени вещества в липозоми. В предишно изследване тези методи бяха приложени успешно за изследване на взаимодействията на лекарствени вещества с протеинови наночастици (Tacheva et al. 2014).

Материали и методи

Като моделно вещество за изследване на взаимодействията лекарство-липозоми е използвано антипсихотичното лекарствено вещество *хлорпромазин* (CPZ) (2-хлоро-10- [3-(диметиламинопропил)] фенотиазин хидрохлорид (Chlorpromazine hydrochloride, CPZ - Sigma)).

Като контролни вещества са използвани и калиев ферицианид $K_3Fe(CN)_6$ и калиев фероцианид $K_4Fe(CN)_6 \cdot H_2O$, (Aldrich), които във воден разтвор дисоциират до редокс двойката йони $Fe(CN)_6^{3-}$ и $Fe(CN)_6^{4-}$. От тях са приготвяни изходни разтвори, които впоследствие са разтваряни в 0.1 M KCl или във физиологичен разтвор (150 mM) NaCl. Малки обеми от тези разтвори бяха добавяни към експерименталните системи за посигане на желаните концентрации.

Липозоми:

Липозомите са получавани по метода на хидратиране на липидна фаза и последващо екструдирание. Приготвя се изходен разтвор на липиди от естествени източници в хлороформ в концентрация 50 mg/ml (L- α -Phosphatidylcholine, Type IV-S, SIGMA). Малък обем от 200 μ l от този разтвор се поставя в облодънна колба и се изчаква пълното изпаряване на разтворителя, като колбата се върти непрекъснато с цел образуване на тънък липиден филм по стените. След видимото изпаряване на хлороформа колбата се поставя за една нощ във вакуумна среда в ексикатор за осигуряване на пълно отстраняване на хлороформа. Вакуумът се постига с помощта на мембранна вакуумна помпа. На следващия ден в колбата се добавят 5 ml физиологичен разтвор последвано от ръчно разклащане на колбата. Водната фаза на физиологичния разтвор хидратираща липидите, които се отделят от стените на колбата и образуват големи многослойни липозоми. Колбата се поставя за 2 мин. в ултразвукова вана за пълно отделяне на липидите от стените към разтвора и за разбиване на големите многослойни липозоми до липозоми с по-малки размери. Така получената липозомна суспензия се прекарва с помощта на екструдер (Avanti Polar Lipids, Inc, USA) последователно през мембрана с размер на порите от 1 μ m и през мембрана с размер на порите от 200 nm. Екструдирането се извършва по 11 пъти през първата и впоследствие 11 пъти през втората мембрана при температура от 52 °C. Така получената суспензия е с концентрация 2 mg/ml на липозоми със среден диаметър от 200 nm.

Експериментална установа

Взаимодействието на амфибилното лекарствено вещество хлорпромазин (CPZ) с липозомите е изследвано с помощта на така наречените „принтирани“ електроди (screen printed electrodes, SPE). Те представляват керамична плочка (3.4 x 1.0 x 0.05 cm) с отложени върху нея тънки слоеве от електропроводящи материали, които играят ролята на електроди. Електродите са разположени близко един до друг. В центъра е работният електрод във формата на кръг с диаметър 4 mm, а около него във формата на дъги са разположени

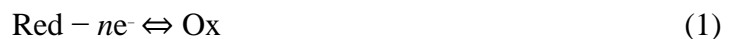
сравнителния и спомагателния електроди. Електродите са отведени с електропроводящи нишки до края на плочката, откъдето могат да се свържат с измерващата апаратура. Електропроводящите нишки са покрити с електроизолиращ материал, така че в центъра на керамичната плочка остават открити само електродите. В хоризонтално положение на плочката трите електрода могат да се покрият с капка от изследвания разтвор с обем от 50 µl. Системата от трите електрода, покрити с изследвания разтвор представлява „електрохимичната клетка“ в която се правят измерванията.

До момента няма общоприет превод на български език на този вид електроди, ние ще използваме съкращението от английското им наименование и ще ги обозначаваме като SPE-електроди. За измерванията в настоящата работа сме използвали въглеродни SPE-електроди (DRP-110, DropSens, Испания). DRP-110 се състоят от въглероден работен електрод с геометрична площ 0.1257 cm², сравнителен електрод от сребро и въглероден спомагателен електрод.

Електрохимични методи

За характеризирание на взаимодействията на хлорпромазина и фери/фероцианида с липозомите са използвани две електрохимични техники – Циклична волтаперометрия (CV) и Електрохимична импедансна спектроскопия (EIS).

Цикличната волтаперометрия се основава на анализа на волтаперните характеристики на окислително-възстановителни (редокс) реакции, протичащи върху работния електрод:



Тук *Red* и *Ox* са съответно редуцирана и окислената форма на изследваното вещество, ne^- броят на електроните e^- , участващи в окислително-възстановителната реакция. При окисление електродът приема електрони от *Red* (правата реакция в (1)), а при редуциране електроните преминават от електрода към *Ox*. Вещества, които обменят електрони с електрода се наричат електроактивни. При цикличната волтаперометрия между работния и сравнителния електрод се подава линейно нарастващо или намаляващо с определена скорост напрежение. При нарастване на напрежението, когато потенциалът върху работния електрод наближи окислително-редукционният потенциал електродът започва да приема електрони от *Red*, като реакцията се засилва при продължаващото нарастване на потенциала. Окислението на *Red* изчерпва тази форма на веществото в близост до електрода, поради което в даден момент окислителният ток започва да намалява. На волтаперограмата, която представлява зависимостта на протичащия през системата ток като функция на потенциала (напрежението), нарастването и последващото намаляване на окислителния ток се проявява като характерен пик със стойност на пиковия ток i_p . Стойността на пиковия окислителен ток зависи от концентрацията и дифузионния коефициент на *Red* в разтвора, от броя на електроните n , участващи в реакцията, от площта на работния електрод и от скоростта на сканиране. След спадане на окислителния ток подаваното напрежение се намалява със същата скорост и реакцията започва да тече в обратната посока, което на волтаперограмата се проявява като отрицателен редукиционен пик. CV може да се използва за характеризирание както на веществата в изследвания разтвор, така и на електродната повърхност (Bard and L.R. Faulkner 1980).

За характеризирание на електродната повърхност е особено подходящ и методът на *Електрохимичната импедансна спектроскопия (EIS)* при който се измерва импедансът на цялата система. Наред с процесите на пренос на електрони методът се прилага много успешно за характеризирание на електродната повърхност, тъй като импедансът на електрода зависи и не само от преноса на електрони, но и от процесите на натрупване и преориентиране на заряди (йони и диполи) по повърхността на електрода (Bard and L.R.

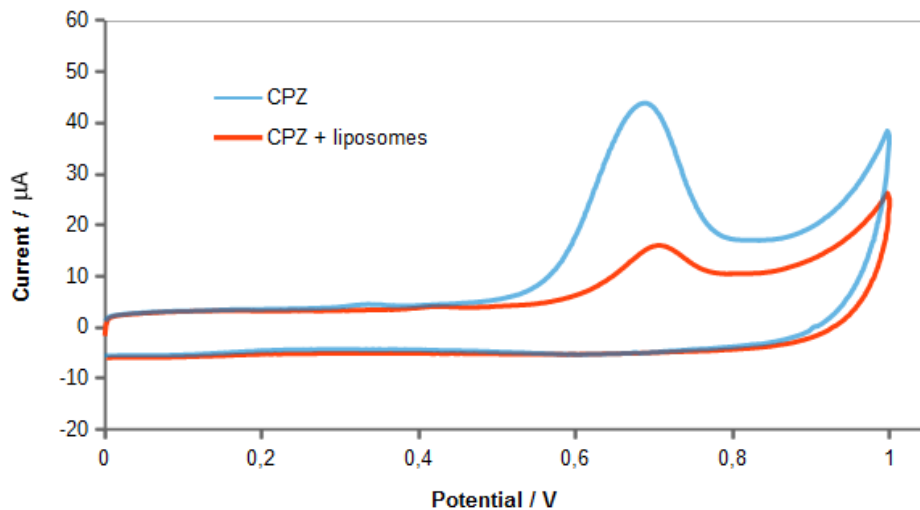
Faulkner 1980) (Macdonald 2005).

Уредът, използван в настоящата работа за електрохимичните измервания CV и EIS е потенциостат/гальваностат/ честотен анализатор на импеданса (VersaStat 3F, Princeton Applied Research, USA).

Данните за импеданса са анализирани посредством апроксимация с еквивалентен електричен модел. Апроксимацията на експерименталните данни е осъществена със софтуера ZSypWin 3.6 (Echem Software, Ann Arbor USA).

Резултати и дискусия

На фиг.1 са показани волтамперограми, получени с въглероден SPE-електрод, на два разтвора с една и съща концентрация на хлорпромазин (CPZ). Във втория разтвор освен CPZ са добавени и липозоми. И на двете волтамперограми личи ясно пикът от окислението на хлорпромазина в областта на потенциалите 0,69- 0,71 V. При наличие на липозоми в разтвора токът на окислителния пик е значително по-нисък. В представения случай намаляването на пиковия ток е 3.3 пъти.

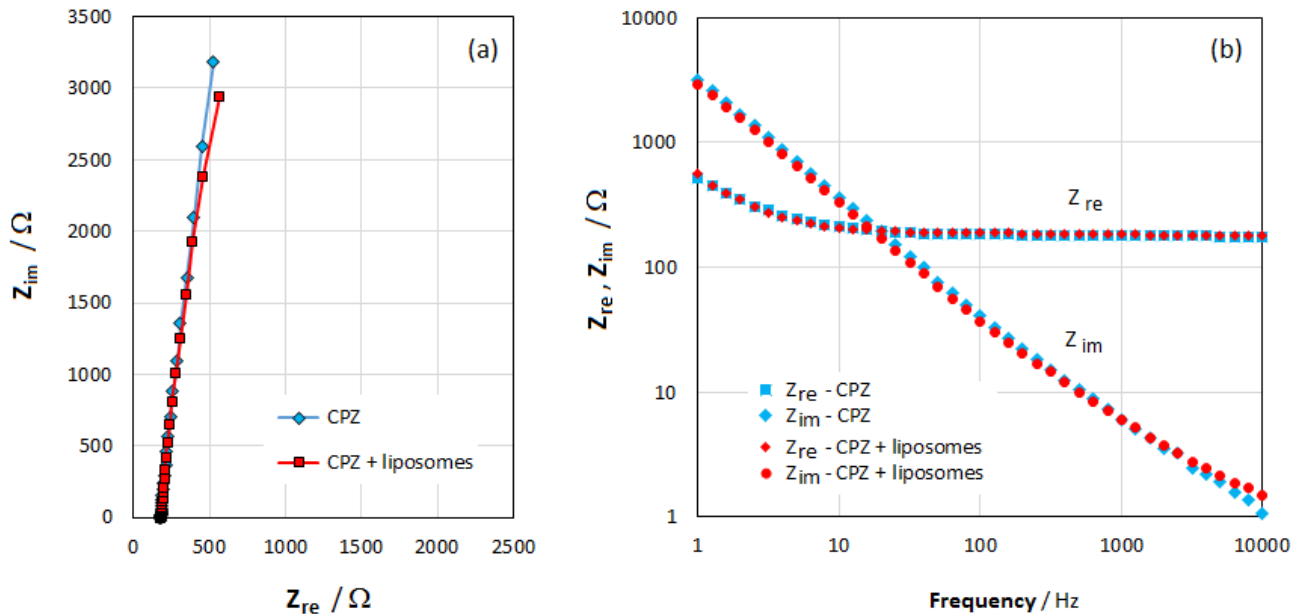


Фиг. 1. Циклични волтамперограми (1-и скан) на SPE-електрод в контакт с 50 μL изследван разтвор:
Синя крива - 50 μM хлорпромазин (CPZ) в разтвор на 0.05 M KCl и 0.075 M NaCl - без липозоми;
Червена крива - 50 μM CPZ и 1 mg/mL липозоми в разтвор на 0.05 M KCl и 0.075 M NaCl;
SPE-електродна система: въглероден работен електрод с геометрична площ 0.1257 cm^2 , сравнителен електрод – Ag, спомагателен електрод – въглерод. Скорост на сканиране 0.05 V/s

Тъй като стойността на пиковият ток на волтамперограмите е пропорционална на концентрацията на електроактивното вещество в контактуващия с електрода разтвор, този резултат може да се тълкува като следствие от вграждане на веществото (в нашия случай CPZ) в липидния бислой на липозомите. Вграждането води до разпределение на CPZ между водната фаза на разтвора и липозомите и оттам до намаляването на концентрацията на CPZ във водната фаза.

От друга страна, пиковият ток е пропорционален и на площта на електрода, поради което полученият резултат може да дължи и на намаляване на активната площ на електрода, породено от адсорбция на липиди от липозомите върху електроодната повърхност. Наличието на подобна адсорбция може да се изследва посредством измерване на импедансния спектър на системата SPE-електрод/липозомна суспензия. Адсорбция на липиди върху електрода би променила значително електричните параметри на електрода – капацитет и съпротивление. Резултати от EIS са представени на фиг.2. Импедансите са измерени при потенциал на работния електрод 0 V, при който няма пренос на заряд заради окисление или редукция на

CPZ. На фиг.2(a) е представена така наречената импедансна диаграма или още диаграма на Nyquist, която представлява зависимостта на имагинерната част на импеданса Z_{im} от неговата реалната част Z_{re} за отделните използвани честоти на измерване. Всяка точка се получава от импеданса $Z=Z_{re} + iZ_{im}$, измерен на определена честота. На фиг.2(a) най-горните точки и на двете криви са от измерванията на най-ниската честота 1 Hz, а с увеличаване на стойността на честотата точките се „спускат“ надолу към абсцисната ос. На фиг. 2(b) са представени директните зависимости на Z_{re} от честотата и на Z_{im} от честотата, или така наречената диаграма на Bode (He and Mansfeld 2009).

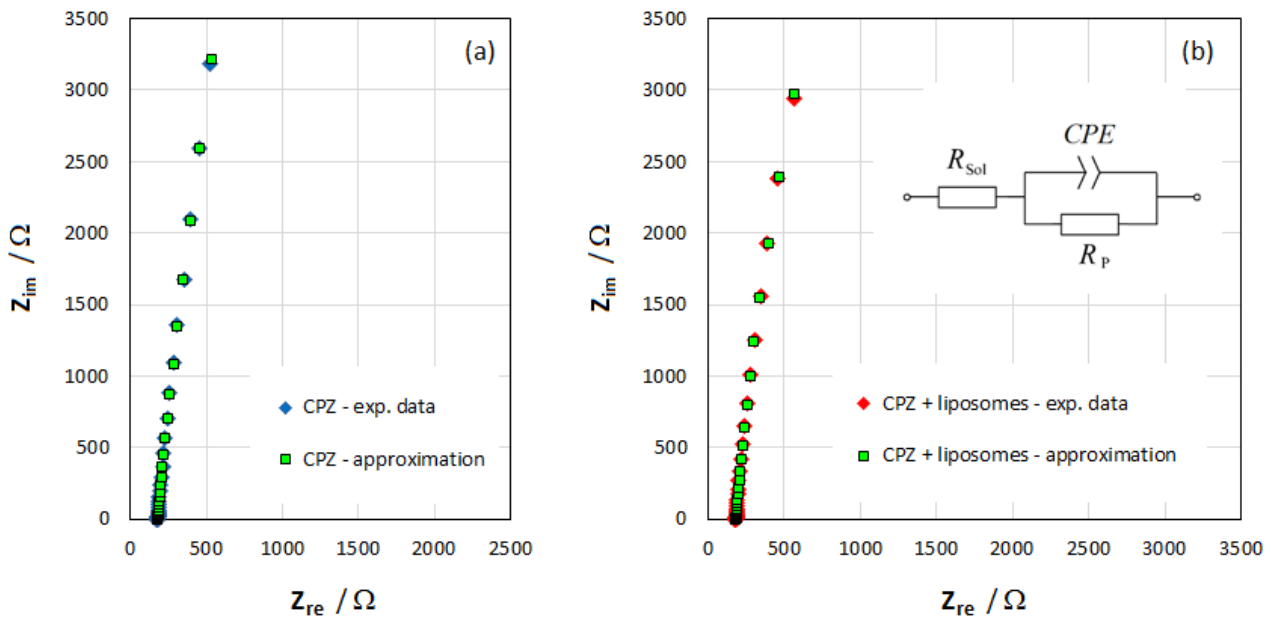


Фиг. 2. Електрохимична импедансна спектроскопия (EIS) на SPE-електрод в контакт с 50 μ L изследван разтвор: (сини маркери и крива) - 50 μ M CPZ в 0.05 M KCl, 0.075 M NaCl – без липозоми в разтвора; (червени маркери и крива) - 50 μ M CPZ в 0.05 M KCl, 0.075 M NaCl – с 1 mg/mL липозоми в разтвора; **SPE-електродна система:** въглероден работен електрод с геометрична площ 0.1257 cm², сравнителен електрод – сребро Ag, въглероден спомагателен електрод; Потенциал на работния спрямо сравнителния електрод – 0 V. (a) Импедансни “Nyquist” диаграми – зависимост на имагинерната от реалната част на импеданса (Z_{re} vs. Z_{im}) при честоти от 1 Hz до 10 kHz; (b) „Bode” диаграми на реалната и имагинерна части на импеданса като функция на честотата;

От сравняването на резултатите за разтворите без наличие на липозоми (сините маркери и крива) и с наличие на липозоми (червените маркери и крива) се вижда, че наличието на липозоми в конкретния случай променя съвсем незначително импеданса на системата електроди-разтвор. Необходимо е да се отбележи, че при използвания честотен диапазон общият импеданс на системата се дължи предимно на импеданса на работния електрод. От което може да се направи заключението, че адсорбция на липиди върху електрода отсъства или е в степен, която е незначителна и не може да обясни голямото намаляване на окислителния ток на волтамограмата от фиг.1. Така се потвърждава първоначалния извод, че намаляването на пиковия ток във волтамограмата се дължи на вграждането на CPZ в липозомите.

За да се направи по-точно количествено сравнение данните от импедансите от фиг. 2 са апроксимирани с еквивалентен електричен модел, съдържащ съпротивления и кондензатори, като всеки елемент от модела съответства на определен физичен процес, който протича на точно определено място в системата електроди-разтвор. Резултатите от апроксимациите са представени на фиг.3, а използваният еквивалентен модел е показан във фиг. 3(b). В този модел импедансът на системата се апроксимира с три елемента – съпротивление R_{sol}

свързано последователно към кръг от успоредно свързани CPE-елемент и съпротивление R_p . R_{sol} представлява омичното съпротивление на разтвора между електродите, а успоредните CPE и R_p представляват импеданса на работния електрод. Импедансът на спомателния електрод от другата страна на разтвора се пренебрегва, тъй като този електрод е с по-голяма площ и импедансът му е много по-малък. CPE-елементът е така нареченият елемент с постоянна фаза, на английски език “Constant phase angle element” (CPE). В идеалният случай вместо него в модела би присъствал кондензатор, чийто капацитет отразява процесите на натрупване на заряди от двете страни на електродната повърхност – йони от разтвора и електрони от електрода. Съпротивлението R_p отразява процесите на пренос на заряд през електродната повърхност и тяхната зависимост от прилаганото напрежение.



Фиг. 3. Апроксимации на експериментални данни за импеданса на разтвор, съдържащ само CPZ (a) и на разтвор, съдържащ CPZ и липозоми (b). Експериментални данни: маркери - сини и червени ромбове; Резултати от апроксимациите: маркери – зелени квадрати. Еквивалентен модел за апроксимациите – на фиг. (b). Описание на модела – в текста. Условия на експеримента – като описаните във фиг.2.

Импедансът на CPE-елемента по дефиниция се дава с израза (Raistrick, Franceschetti, and Macdonald 2005):

$$Z_{CPE} = Q^{-1}(i\omega)^{-n} \tag{1}$$

В този израз Q и n са параметрите на CPE-елемента, i е имагинерната единица, а ω е кръговата честота $\omega=2\pi f$. Степенният показател n може да приема стойности от 0 до 1, като тази стойност отразява отклонението на реалния процес от идеализирания случай. При $n=1$ CPE има поведение на идеален кондензатор с капацитет Q , а при $n=0$ CPE се превръща в идеален резистор със съпротивление Q^{-1} . Когато с CPE се апроксимира процес с очаквано капацитивно поведение, отклонението на n към стойности по-малки от 1 се дължи на необратими загуби на енергия по време на преместването на зарядите в процесите на поляризация за един цикъл на подаваното променливо напрежение (Jonscher 1975).

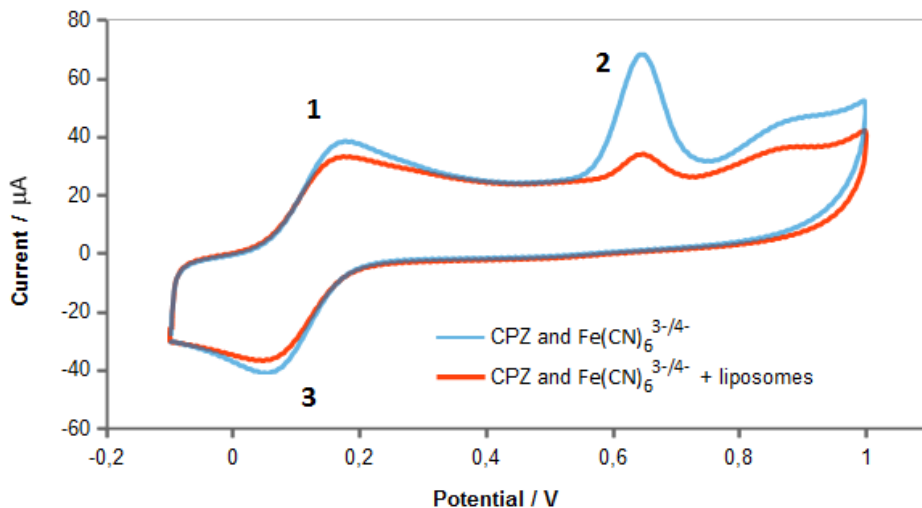
Резултатите от апроксимациите за случаите на CPZ в разтвора при отсъствие и при наличие на липозоми са приведени в таблица 1.

Таблица 1. Резултати от апроксимациите на експерименталните данни за импеданса на изследваната система, съдържаща само CPZ или CPZ и липозоми

Вещества в разтвора	R_{sol} / Ω	Q (CPE) / $\mu S \cdot s^n$	n (CPE)	$R_p / k\Omega$
CPZ	178,9	54,21	0,946	123,8
CPZ и липозоми	183,3	57,39	0,954	53,5

От таблица 1 се вижда, че R_{sol} , Q и n почти не се повлияват от наличието на липозоми в разтвора. Стойността на Q , която съответства на еквивалентния капацитет на работния електрод при $\omega = 1 \text{ rad/s}$ дори нараства малко, което отново е потвърждение за липсата на адсорбция на липиди върху електрода. Подобна адсорбция би се отразила в значително намаляване на еквивалентния капацитет на електрода, тъй като диелектричната проницаемост на въглеродните опашки е 35 пъти по-малка от диелектричната проницаемост на електролитната среда. Доколкото при 0 V няма пренос на заряди намаляването на R_p най-вероятно се дължи на общо нарастване на загубите, дължащи се не на пренос на заряди през електродната повърхност, а на нарастнали загуби при натрупване и преориентация на зарядите и диполите в близост до електродната повърхност.

Вграждането на CPZ в липозомите се дължи на неговата амфибилна природа. За да проверим доколко наблюдаваните резултати се дължат на хидрофобните взаимодействия между CPZ и липидите в липозомите проведохме сходни експерименти с хидрофилните вещества ферицианид и фероцианид. Двете преминават едно в друго при процесите на окисление и редукция, поради което към изследвания разтвор добавяхме еквимоларна смес на калиев ферицианид $K_3Fe(CN)_6$ и калиев фероцианид $K_4Fe(CN)_6 \cdot H_2O$, които след дисоциацията във водния разтвор дават двойката електроактивни йони $Fe(CN)_6^{3-}$ и $Fe(CN)_6^{4-}$. Ферицианида и фероцианида бяха добавяни заедно с CPZ в изследваните разтвори за да се направи директно сравнение на поведението на хидрофилните вещества $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ и на амфибилното вещество CPZ. Волтаперометричните (CV) резултати са показани на фиг. 4.



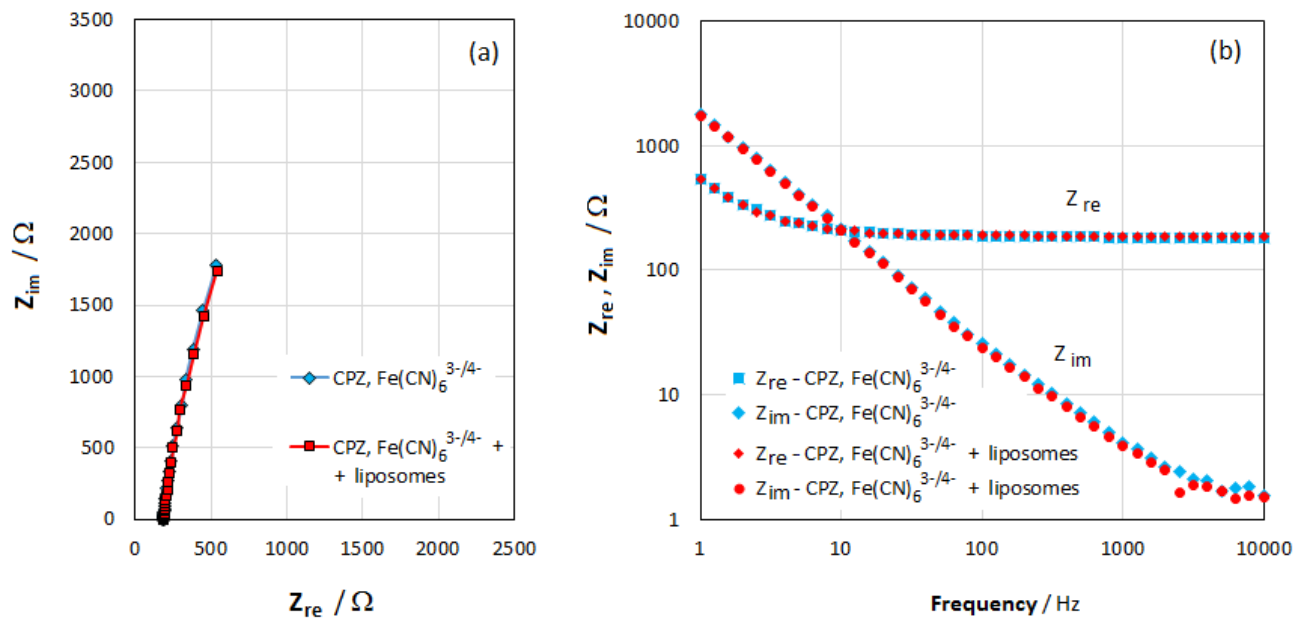
Фиг. 4. Циклични волтаперограми (1-и скан) на SPE-електрод в контакт с $50 \mu L$ изследван разтвор:

Синя крива - $68 \mu M$ CPZ, $2,71 \text{ mM}$ $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ в електролитна среда 130 mM NaCl и 3.6 mM фосфатен буфер с pH 7 - без липозоми; Червена крива - $68 \mu M$ CPZ, $2,71 \text{ mM}$ $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, $1,7 \text{ mg/mL}$ липозоми в 130 mM NaCl и 3.6 mM фосфатен буфер с pH 7.

SPE-електродна система: въглероден работен електрод с геометрична площ 0.1257 cm^2 , сравнителен електрод – Ag, спомагателен електрод – въглерод. Скорост на сканиране 0.05 V/s ;

И в двете волтампереграми, получени при отсъствие на липозоми (синя крива) и при наличие на липозоми в разтвора (червена крива), се виждат ясно пиковете на окисление на $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (пик 1), на редукция на $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ и на окисление на CPZ (пик 3). Както и при резултатите от фиг. 1, окислителният пик на CPZ намалява силно при наличието на липозоми в разтвора. Намаляването е 4,4 пъти и е по-голямо от това на фиг.1, което може да се обясни с по-голямата концентрация на липозомите в разтвора. В същото време окислителният пик на $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ и на редукционният пик на $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ намаляват съвсем незначително, което от една страна показва липса на взаимодействие между $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ и липозомите, а от друга страна отново показва, че липозомите не взаимодействат с електродната повърхност и не я „замърсяват“, пречейки по този начин на преноса на електрони през нея. Различното поведение на хидрофилната двойка $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ и на амфифилното лекарство CPZ отново потвърждава извода, че наблюдаваните ефекти се дължат на взаимодействието на CPZ с липозомите в разтвора

Данните от импедансите на системата, съдържаща само CPZ и $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ и на системата съдържаща CPZ, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ и липозоми са показани на фиг. 5. Резултатите от апроксимациите на импедансните данни с дискутирания по-горе модел са изобразени на фиг.6 и представени в Таблица 2.



Фиг. 5. Електрохимична импедансна спектроскопия (EIS) на SPE-електрод в контакт с 50 μL изследван разтвор:

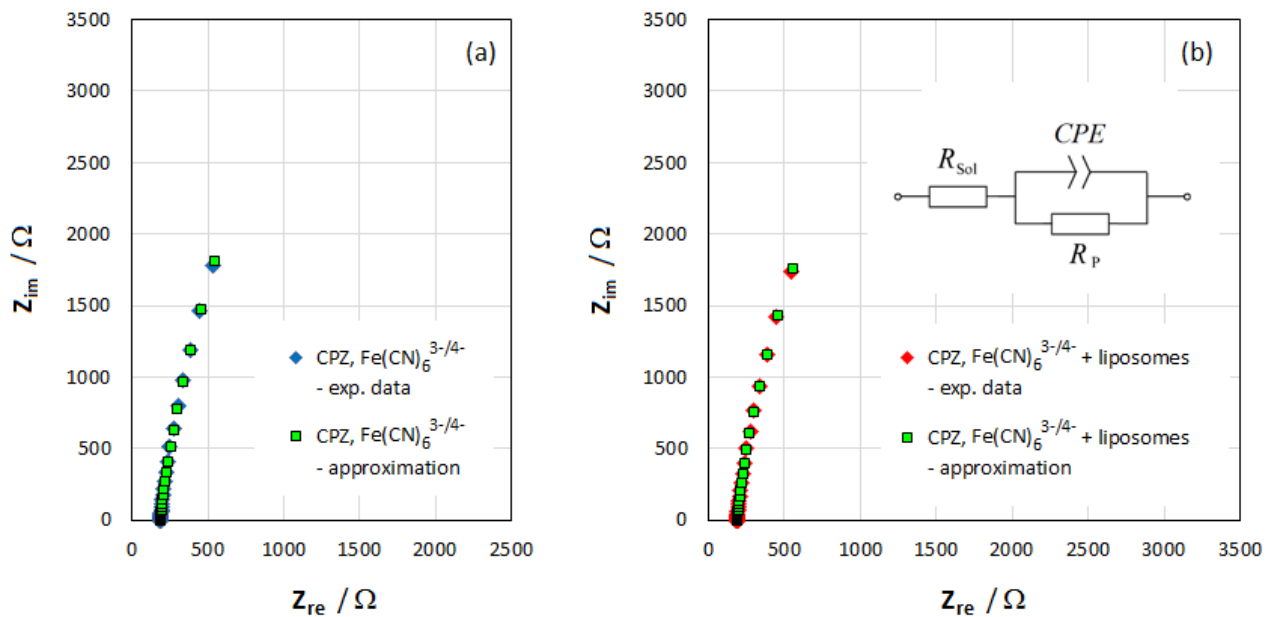
(сини маркери и крива) - 68 μM CPZ, 2,71 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ в електролитна среда 130 mM NaCl и 3.6 mM фосфатен буфер с рН 7 - без липозоми;

(червени маркери и крива) - 68 μM CPZ, 2,71 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 1,7 mg/mL липозоми в 130 mM NaCl и 3.6 mM фосфатен буфер с рН 7;

SPE-електродна система: въглероден работен електрод с геометрична площ 0.1257 cm^2 , сравнителен електрод – сребро Ag, въглероден спомагателен електрод; Потенциал на работния спрямо сравнителния електрод – 0 V.

(а) Импедансни “Nyquist” диаграми – зависимост на имагинерната от реалната част на импеданса (Z_{re} vs. Z_{im}) при честоти от 1 Hz до 10 kHz;

(б) „Bode” диаграми на реалната и имагинерна части на импеданса като функция на честотата;



Фиг. 6. Апроксимации на експериментални данни за импеданса на разтвор, съдържащ CPZ и $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ (a) и на разтвор, съдържащ CPZ, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ и липозоми (b). Експериментални данни: маркери - сини и червени ромбове; Резултати от апроксимациите: маркери – зелени квадрати. Еквивалентен модел за апроксимациите – на фиг. (b). Описание на модела – в текста. Условия на експеримента – като описаните във фиг.5.

Таблица 2. Резултати от апроксимациите на експерименталните данни за импеданса на изследваната система, съдържаща само CPZ и $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ или CPZ, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ и липозоми

Вещества в разтвора	R_{sol} / Ω	$Q (CPE) / \mu S.s^n$	$n (CPE)$	$R_p / k\Omega$
CPZ, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$	184,1	96,83	0,930	21,6
CPZ, $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ и липозоми	187,2	98,35	0,935	17,4

Резултатите, приведени във фиг.5, фиг.6 и таблица 2 затвърждават направените изводи, че наличието на липозоми в разтвора не променя импеданса и електрическите параметри на работния електрод. При наличие на $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ и CPZ в разтвора параметрите на електродния импеданс са различни в сравнение със случая, когато в разтвора присъства само CPZ. Причината за това е във факта, че импедансът е измерен при потенциал на работния електрод 0 V, при който има пренос на заряди между $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ и електрода. Това се вижда най-вече от значително по-ниската стойност на R_p – 21,6 kΩ сравнено със 123 kΩ, когато в разтвора няма $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ (виж табл.2). В присъствието на липозоми R_p намалява слабо, а параметрите на CPE-елемента Q и n се променят в съвсем незначителна степен, отново потвърждавайки заключението за липса на адсорбция на липиди от липозомите върху електрода. По този начин сравняването на волтамперограмите получени при отсъствие и при наличие на липозоми може да даде информация за евентуално взаимодействие лекарство-липозоми.

Заклучение

Електрохимичната техника циклична волтамперометрия е подходящ и лесно приложим метод за изследване взаимодействията хлорпромазин-липозоми. С негова помощ се доказва косвено вграждането на хлорпромазина в липозомите *in situ* без да се налага използването на допълнителни техники за сепариране на отделните фази на разтворите, като центрофугиране

и др. Използването на метода може да се разшири и за други лекарствени вещества, както и за изследване на други нано- и микрочастици с цел проучване на инкорпориращата им способност. Необходимо условие за това е да липсва взаимодействие между частиците и електродната повърхност, като за целта е най-удачно да се използват допълнителни електрохимични техники като импедансната спектроскопия.

Благодарности

Изследванията по настоящата работа са финансирани от Фонд „Научни изследвания“ – проект № ДНТС/Китай/01/11/ от 04.12.2014.

Литература

- Allen, Theresa M. 1996. “Liposomal Drug Delivery.” *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1 (5): 645–51. doi:10.1016/S1359-0294(96)80103-8.
- Bard, A.J., and L.R. Faulkner. 1980. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. New York: Wiley.
- Bethune, Claudette, Aleksander Blum, J. Russell Geyer, John R. Silber, and Rodney J. Y. Ho. 1999. “Lipid Association Increases the Potency Against Primary Medulloblastoma Cells and Systemic Exposure of L-(2-Chloroethyl)-3-Cyclohexyl-1-Nitrosourea (CCNU) in Rats.” *Pharmaceutical Research* 16 (6). Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers: 896–903. doi:10.1023/A:1018886321917.
- Çağdaş, Melis, Ali Demir Sezer, and Seyda Bucak. 2014. “Application of Nanotechnology in Drug Delivery.” In *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, edited by Ali Demir Sezer. InTech. doi:10.5772/57028.
- He, Zhen, and Florian Mansfeld. 2009. “Exploring the Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) in Microbial Fuel Cell Studies.” *Energy Environ. Sci.* 2 (2). Royal Society of Chemistry: 215–19. doi:10.1039/B814914C.
- Jonscher, A. K. 1975. “The Interpretation of Non-Ideal Dielectric Admittance and Impedance Diagrams.” *Physica Status Solidi (a)* 32 (2): 665–76. doi:10.1002/pssa.2210320241.
- Klopman, Gilles, and Hao Zhu. 2005. “Recent Methodologies for the Estimation of N-Octanol / Water Partition Coefficients and Their Use in the Prediction of Membrane Transport Properties of Drugs.” *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 5 (2). Bentham Science Publishers: 127–33. doi:10.2174/1389557053402765.
- Macdonald, J. Ross. 2005. “Impedance Spectroscopy: Models, Data Fitting, and Analysis.” *Solid State Ionics* 176 (25–28): 1961–69. doi:10.1016/j.ssi.2004.05.035.
- Raistrick, Ian D., Donald R. Franceschetti, and J. Ross Macdonald. 2005. “Theory.” In *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, edited by Evgenij Barsoukov and J. Ross Macdonald, 27–128. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Shahin, Mostafa, Rania Soudy, Hamidreza M Aliabadi, Norman Kneteman, Kamaljit Kaur, and Afsaneh Lavasanifar. 2013. “Engineered Breast Tumor Targeting Peptide Ligand Modified Liposomal Doxorubicin and the Effect of Peptide Density on Anticancer Activity.” *Biomaterials* 34 (16): 4089–97. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.02.019.
- Tacheva, B, A Zheleva, R Georgieva, W Tong, Ch Gao, and M Karabaliev. 2014. “Interactions of BSA-Nanoparticles with Some Electroactive Drugs.” *Trakia Journal of Sciences* 12 (Suppl. 1): 84–88.