

**ЕЛЕКТРОХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВГРАЖДАНЕТО НА НА  
ЛЕКАРСТВЕНОТО ВЕЩЕСТВО ТИОРИДАЗИН В ЛИПОЗОМИ**

**Билиана Тачева, Бояна Първанова, Иван Танев Иванов, Радостина Георгиева,  
Мирослав Карабалиев \***

*Катедра “Медицинска физика, биофизика, рентгенология и радиология”, Медицински  
факултет, Тракийски университет, Стара Загора, България*

*\* miroslav.karabaliev@trakia-uni.bg*

**Резюме:**

Изследвано е вграждането на амфифилното електроактивно лекарство тиоридазин (TDZ) е изследвано *in situ* с помощта на метода на правоъгълна вълнова волтаперометрия (SWV). SWV-волтаперограмата на разликата между „правия“ и „обратния“ ток,  $\Delta i = i_f - i_r$ , е пропорционална на концентрацията на TDZ в изследвания разтвор. 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 TDZ. Показано е, че наличието на липозоми не променя волтаперограмата на хидрофилното вещество фероцианд, което е индикация, че при TDZ полученият резултат се дължи именно на взаимодействието на лекарственото вещество с липозомите. Определен е моларният коефициент на разпределение на TDZ между липозомите и водната фаза.

**Ключови думи:** *липозоми, тиоридазин, лекарствени вещества, правоъгълна вълнова волтаперометрия*

**Въведение:**

Изучаването на лекарствено-мембранните взаимодействия е от съществено значение за изясняване на механизмите на действие и ефективността на лекарствените вещества. Липозомите са моделна мембранна система, използвана широко за проучване на взаимодействията на лекарствени вещества с липидния бислой на биологичните мембрани. Вграждането на лекарствата в мембраните е директно свързано с тяхната ефективност. По тази причина ефективността на лекарственото вещество обикновено 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 (Klorman and Zhu 2005). Но липозомните моделни мембрани са по-добра алтернатива в сравнение с традиционните методи, използвани за оценка на коефициентите на разпределение, тъй като могат да възпроизведат йонните взаимодействия, които възникват 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). Те могат да бъдат изградени от един бислой или да бъдат многослойни, т.е. изградени от много бислоеве,

На липозомите винаги се възлагат и 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, антибактериални, фунгицидни и противовъзпалителни лекарствени вещества. Има и няколко одобрени за клинично използване липозомни системи – липозомен doxorubicin, липозомен daunorubicin, amphotericin B (Allen 1996). Липозоми са използвани и като преносители на нитрозоурейта ломустин (CCNU)

(Bethune et al. 1999). Установено е, че свързването на CCNU с липозомите може да повиши стабилността на лекарството, потенциалът му, и системната експозиция.

Целта на настоящата работа е да се покаже, че чрез електрохимични методи може да се доказва и проследява вграждането на амфифилни лекарствени вещества в липозоми. В предишни изследвания електрохимичният метод циклична волтаперометрия беше приложен успешно за изследване на взаимодействията на лекарствени вещества с протеинови наночастици (B Tacheva et al. 2014) и с липозоми (Тачева, Първанова, Георгиева, and Карабалиев 2017). В настоящата работа е приложен друг електрохимичен метод – правоъгълна вълнова волтаперометрия.

### Материали и методи:

Като моделно вещество за изследване на взаимодействията лекарство-липозоми е използвано антипсихотичното лекарствено вещество *тиоридазин* (TDZ) ((±) -2-метилтио-10-[2- (1-метил-2-пиперидил) етил] -фенотиазин хидрохлорид (Thioridazine hydrochloride)), търговски продукт на фирмата Sigma-Aldrich, USA.

Като контролно вещество е използван калиев фероцианид  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ , (Potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate, Sigma-Aldrich), който във воден разтвор дисоциира до  $4K^+$  и  $Fe(CN)_6^{4-}$ .

От изследваното и контролното вещество са приготвяни изходни разтвори, които впоследствие са разтваряни в 0.1 M KCl или във физиологичен разтвор (0.15 M) NaCl. Малки обеми от тези разтвори бяха добавяни към експерименталните системи за постигане на желаните концентрации.

#### *Липозоми:*

В настоящата работа са използвани мултислойни липозоми, получени по метода на хидратиране на липидна фаза. Липозомите се приготвят от фосфатидилхолин (L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine, Type IV-S, SIGMA), разтворен в хлороформ в концентрация 50 mg/ml. 200  $\mu$ l от този разтвор се поставят 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 под вакуум в ексикатор за 4 часа. Вакуумът се постига с помощта на мембранна вакуумна помпа и има за цел пълното отстраняване на хлороформа. След това 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 е с концентрация на липидите 2 mg/ml.

#### *Експериментална установка*

За изследване на взаимодействието на амфифилното лекарствено вещество тиоридазин (TDZ) с липозомите са използвани 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. Работният електрод е кръг с диаметър 4 mm, разположен в центъра, а около него във формата на дъги са разположени сравнителния и спомагателния електроди. Електродите са отведени с електропроводящи нишки до края на плочката, откъдето се свързват жат 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 до 100  $\mu\text{l}$ . Системата от трите електрода, покрити с изследвания разтвор е „електрохимичната клетка“, в която се правят измерванията.

За измерванията в настоящата работа са използвани златни SPE-електроди (DRP-220AT, DropSens, Испания). DRP-220AT се състоят от златен работен електрод с геометрична площ 0.1257  $\text{cm}^2$ , златен спомагателен електрод и сравнителен електрод от сребро.

#### Електрохимични методи

За характеризиране на взаимодействията на тиоридазина (TDZ) и фероцианида ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ) с липозомите е използвана електрохимичната техника правоъгълна вълнова волтамперометрия (square wave voltammetry, SWV) (Bard and L.R. Faulkner 1980).

При тази техника между работния и сравнителния електрода се подава изменящ се електричен потенциал, който е сума от два скокообразно изменящи се напрежения (потанциали). Единият потенциал представлява правоъгълни импулси с определена амплитуда ( $2\Delta E_p$ ), ширина на импулса ( $t_p$ ) и разстояние между импулсите  $2t_p$ , т.е. това е правоъгълната вълна (square wave) с амплитуда  $\Delta E_p$  и честота  $f = 1/2t_p$ . Другият потенциал е стъпаловидно нарастващ, с амплитуда на стъпалото (стъпката)  $\Delta E_s$  и същата честота  $f = 1/2t_p$ , като стъпалото съвпада с положителния фронт на импулсите в правоъгълната вълна. В резултат на сумирането на двата сигнала се получава правоъгълна вълна с линейно нарастваща „базова“ линия. Сканирането започва при начален потенциал  $E_i$ , а скоростта на сканиране е  $v = \Delta E_s/2t_p = f \Delta E_s$ . По време на сканирането, токът през електрохимичната клетка се измерва и записва по два пъти на цикъл, в края на всеки импулс. „Правият“ ток (или токът в посоката на сканирането, forward current sample),  $i_f$ , е токът в края на първия „положителен“ импулс на всеки цикъл по посоката на стъпаловидното сканиране. „Обратният“ ток (reverse current sample),  $i_r$ , е токът измерван в края на отрицателния импулс в цикъла (по-точно импулса обратен на посоката на сканирането). Изчислява се и разликата в двойката стойности за всеки цикъл  $\Delta i = i_f - i_r$ . И трите тока  $\Delta i$ ,  $i_f$  и  $i_r$  имат диагностична стойност, така че пълният запис от едно сканиране с SWV представлява три волтамперограми - „правият“ ток, „обратният“ ток и разликата между двата като функции на приложения потенциал. Най-често обаче, се използва волтамперограмата на  $\Delta i$ , която представлява крива която има пик при потенциал  $E_{1/2} = E^{0'} + (RT/nF)\ln(D_R/D_O)^{1/2}$  и стойност на максималния ток в пика  $\Delta i_p$  зависи от концентрацията на изследваното вещество:

$$\Delta i_p = \frac{nFA D_R^{1/2} C_R^*}{\pi^{1/2} t_p^{1/2}} \Delta \Psi_p \quad (1)$$

Формула 1 е написана за случая, когато сканирането се прави в посока към нарастване на потенциала към положителни стойности където протича окисление на изследваното вещество.  $n$  е броят на електроните участващи в окислителната реакция,  $D_R$  и  $C_R^*$  са дифузионния коефициент и обемната концентрация на редуцираната форма на изследваното вещество,  $F$  е Фарадеевата константа,  $A$  е площта на работния електрод, а  $\Delta \Psi_p$  е пиковата стойност на безразмерната функция  $\Psi$ , която зависи от  $n$ ,  $\Delta E_p$  и  $\Delta E_s$ . Сканирането може да бъде и в посока към по-отрицателни потенциали, където протичат процесите на редукция. В този случай във формула едно участват дифузионният коефициент и обемната концентрация на окислената форма на изследваното електроактивно вещество.

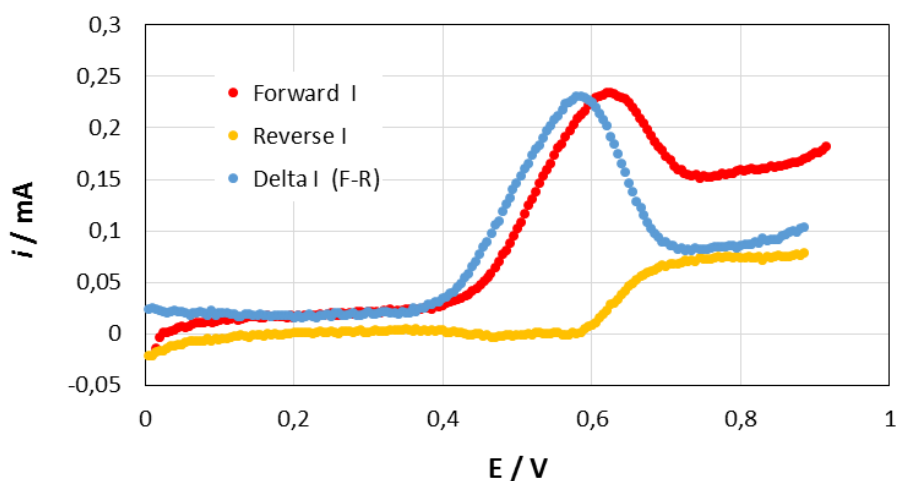
Основното предимство на SWV е, че във волтамперограмата  $\Delta i(E)$  фоновият ток от зареждането на капацитета на двойния електричен слой на работния електрод, е до голяма степен отстранен. Това се дължи на факта, че правият и обратния ток се измерват в края на

съответните импулси, когато двойният електричен слой вече е зареден и капацитивният ток е спаднал (в идеалния случай до нула) (Bard and L.R. Faulkner 1980).

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

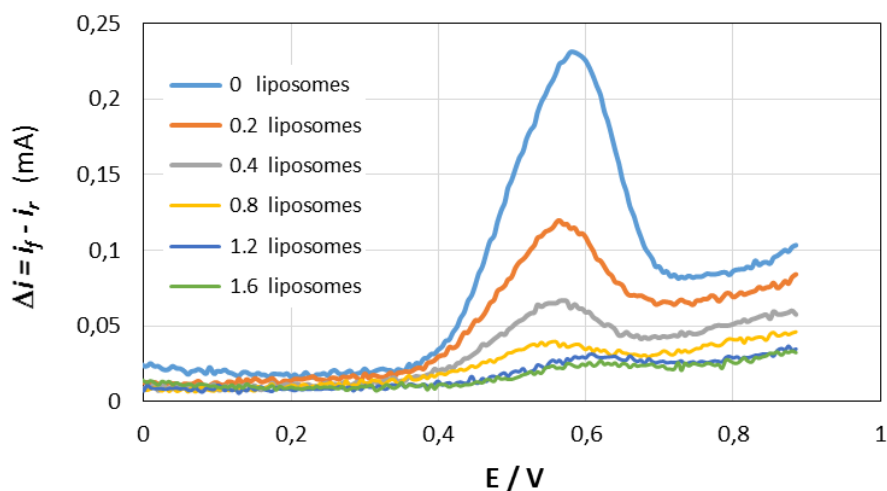
## Резултати и дискусия

На фиг. 1 са показани три волтампереграми, получени при SWV-сканиране на разтвор с 0.2 mM TDZ, на правия ток, на обратния ток и на разликата между двата.



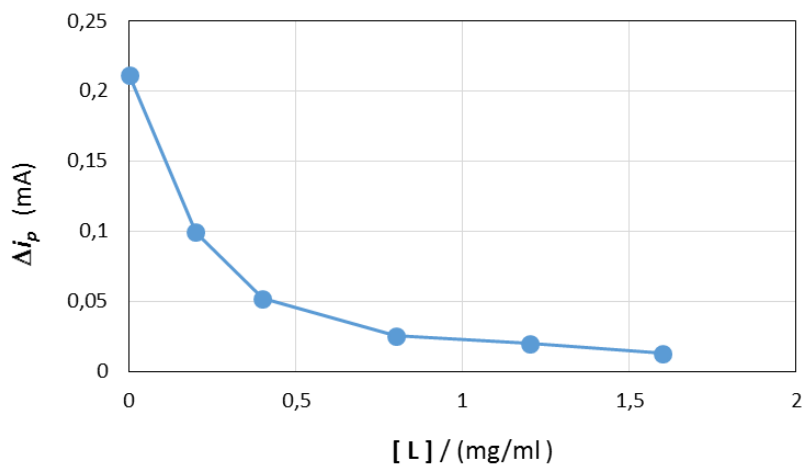
**Фиг. 1.** SWV-волтампереграми на 0.2 mM TDZ. “Прав“ ток (*forward I*), “обратен“ ток (*reverse I*) и разликата между правия и обратния ток (*Delta I (F-R)*). Изследван разтвор - 0.2 mM TDZ в 120 mM NaCl, 2 mM MOPS буфер, pH 7.4. Честота на SWV,  $f = 1000$  Hz. Амплитуда на импулса  $\Delta E_p = 15$  mV, стъпка  $\Delta E_s = 5$  mV.

Тъй като лекарственото вещество TDZ е амфифилно, при добавяне на липозоми в разтвора, една голяма част от TDZ-молекулите се вграждат в липидния бислой на липозомите. Разпределението на TDZ между водната фаза и липозомите води до намаляване на обемната концентрация на TDZ, който е във водната фаза. Това би трябвало да доведе до намаляване на измерения ток в SWV-волтампереграмите. На фиг. 2 са показани SWV-волтампереграми на същото количество TDZ (0.2 mM), с различно количество добавени липозоми в разтвора.



**Фиг. 2.** SWV-волтампереграми на 0.2 mM TDZ, при наличие на липозоми в разтвора. Концентрацията на липозомите е в mg липиди на ml суспензия, и е указана във фигурата за отделните криви. Параметрите на SWV и концентрациите на поддържащия електролит и буфера са като указаните във фиг. 1.

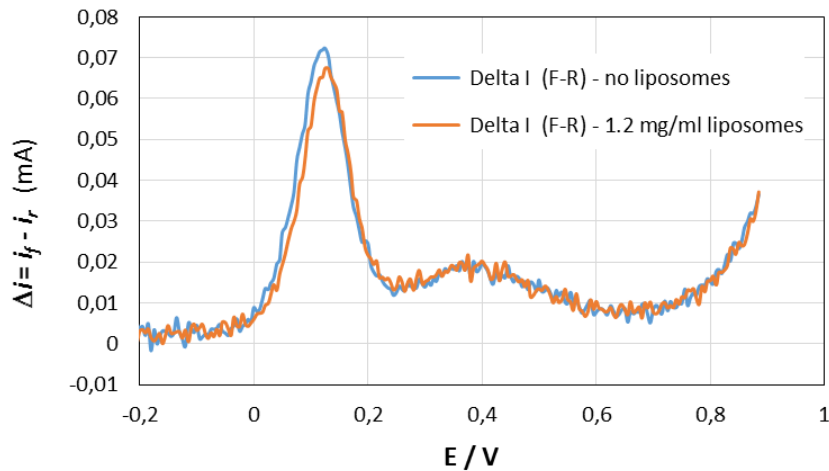
От резултатите представени на фиг. 2 се вижда ясно, че при нарастване на концентрацията на липозомите, пикът на SWV-волтампереграмата намалява постепенно, което е индикация за взаимодействие на TDZ с липозомите. Зависимостта на пиковия ток от концентрацията на липозомите в разтвора е показана на фиг. 3



**Фиг. 3.** Зависимост на пика на SWV-волтампереграмата на 0.2 mM TDZ от концентрацията на липозомите в разтвора, изразена в mg/ml. Параметри на експеримента – като указаните във фог. 1 и фиг. 2.

Намаляването на тока от окислението на TDZ при наличие на липозоми би могло да се дължи също така и на предизвикано от липозомите затрудняване на условията за електронен пренос през електродната повърхност, т.е. на блокиране на електронния пренос поради адсорбция на липиди върху повърхността на електрода. В нашите изследвания сме показали, че наличието на липиден филм върху електрода не затруднява окислително-редукционните реакции на фенотиазинови лекарствени вещества, тъй като те проникват в липидната фаза на филмите и достигат до повърхността на електрода (Bilyana Tacheva, Georgieva, and Karabaliev 2016). Въпреки това, за да проверим евентуално блокиране на електродите от липозомите, в настоящото изследване проведохме SWV на  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  в присъствието на липозоми. Фероцианидният анион  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  е хидрофилен, не прониква през липидната фаза, когато

върху електрода има отложен липиден филм, и не се очаква да прониква и в липидната фаза на липозомите. Резултати от SWV на  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , при отсъствие и при наличие на липозоми в разтвора са представени на фиг. 4.



**Фиг. 4.** SWV-волтамперограми на  $1 \text{ mM Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , при наличие на  $1.2 \text{ mg/ml}$  липозоми в разтвора. Параметрите на SWV и концентрациите на поддържащия електролит и буфера са като указаните във фиг. 1.

От фиг. 4 ясно се вижда, че наличието на  $1.2 \text{ mg/ml}$  липозоми променя в нищожна степен пика на окислението на  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . Това е ясна индикация, че липозомите не взаимодействат с  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , както и че не блокират електронния пренос през електродната повърхност. Следователно, намаляването на тока на окисление на TDZ в присъствието на липозоми (фиг. 2 и фиг. 3) се дължи на вграждането на TDZ в липозомите.

Зависимостта на пиковия ток  $\Delta i_p$  на TDZ от концентрацията на липозомите дава възможност да се определи моларният коефициент на разпределение на TDZ между водната и липидната фаза в липозомната суспензия,  $K_p$ . В предишна работа докладвахме определянето на този коефициент посредством метода на втората производна на абсорбционния спектър (Тачева, Първанова, Георгиева, Желева, et al. 2017). По определение  $K_p$  е равен на отношението на моларната концентрация на веществото в липозомите към моларната концентрация на веществото във водата (Keisuke Kitamura et al. 1995)(K Kitamura 1998)(Takegami et al. 2002)(Poła et al. 2004). Същественото е че концентрациите са изразени като отношения mol/mol, т.е.:

$$K_p = \frac{\text{mol of drug in lipid/mol of lipid}}{\text{mol of drug in water/mol of water}} \quad (2)$$

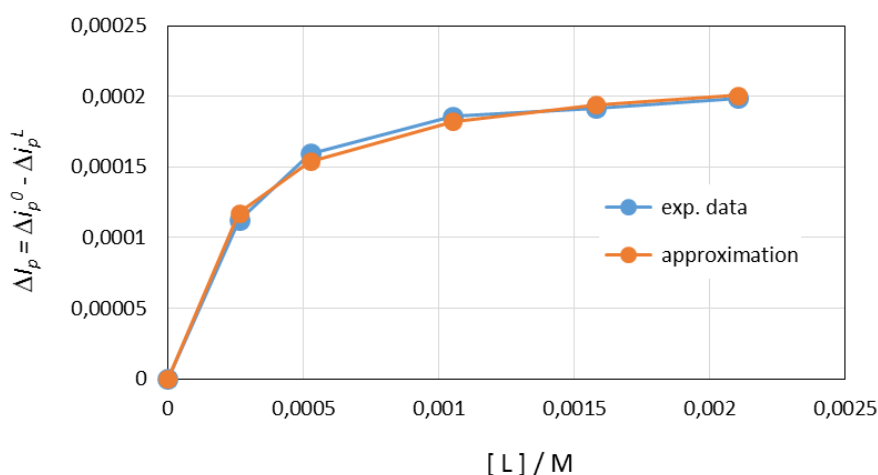
Определянето на  $K_p$  става посредством така нареченото уравнение на Scott:

$$\Delta I_p = \frac{K_p \Delta I_p^{\max} [L]}{[W] + K_p [L]} \quad (3)$$

В уравнение (3)  $\Delta I_p$  е разликата между пиковия ток  $\Delta i_p^0$  при концентрация на липидите нула и пиковия ток  $\Delta i_p^L$  при концентрация на липидите  $[L]$ ,  $\Delta I_p = \Delta i_p^0 - \Delta i_p^L$ . Величината  $\Delta I_p^{\max}$  е максимално възможната разлика, която би се получила ако цялото количество на изследваното лекарствено вещество е вградено в липозомите.  $[L]$  и  $[W]$  са моларните концентрации на липидите и водата в разтвора -  $[W]$  се приема за  $55 \text{ mol/L}$ . От

експерименталните данни се построява зависимостта  $\Delta I_p = f([L])$ , а  $K_p$  и  $\Delta I_p^{\max}$  се определят от апроксимацията на зависимостта с функцията (3). Апроксимацията е по метода на най-малките квадрати. Експериментални резултати заедно с направената апроксимация са представени на фиг. 5. Вижда се, че експерименталните данни се апроксимират много добре с уравнението на Scott, което е още едно потвърждение, че намаляването на тока при увеличаване на концентрацията на липозомите се дължи на вграждането на TDZ в липозомите. Резултатите от апроксимацията на експерименталните данни на фиг. 5 са  $K_p = 2,31 \times 10^5$  и  $\Delta I_p^{\max} = 2,23 \times 10^{-4}$  А. Интересно е да се отбележи, че тази стойност е от същия порядък и много близка до стойността за  $K_p$  определена в (Тачева, Първанова, Георгиева, Желева, et al. 2017) по метода на втората производна на абсорбционния спектър.

Стойностите за  $K_p$  за TDZ, измерени с двата различни метода са приведени в таблица 1. Стойността на коефициента на разпределение, получена по метода на втората производна на абсорбционния спектър е докладваната в (Тачева, Първанова, Георгиева, Желева, et al. 2017). Стойността за  $K_p$ , получена посредством прилагания в тази работа метод SWV, е средна стойност от четири серии измервания, а границите са  $\pm 2SD$  ( $\pm$  два пъти стандартното отклонение). Доверителните интервали на стойностите, получени по двата независими метода, се припокриват, което е още едно потвърждение за ефективността на метода SWV за определяне на степента на вграждане на TDZ в липозоми.



**Фиг. 5.** Зависимост на пиковия SWV-ток, изразена като  $\Delta I_p = \Delta i_p^0 - \Delta i_p^L$  от моларната концентрация на липидите в разтвора. Експериментални данни (плътни точки) и апроксимационни данни (кръгове). Данните от апроксимацията са  $K_p = 2,31 \times 10^5$  и  $\Delta I_p^{\max} = 2,23 \times 10^{-4}$  А

**Таблица 1.** Моларен коефициент на разпределение  $K_p$  на TDZ между липозоми и водна фаза (буфериран физиологичен разтвор, рН 7.4), получен по два различни метода

$K_p$ ( $\times 10^{-5}$ )	Метод на определяне
$2,58 \pm 0,47$	SWV
$3,73 \pm 0,89$	Втора производна на абсорбционния спектър

### Заклучение

Представените изследвания демонстрират възможността посредством електрохимичната техника SWV да се изследва *in situ* вграждането на електроактивни лекарствени вещества в липозоми. Измереният моларен коефициент на разпределение на TDZ между липидната и водната фаза е много близък до измерения с други методи, коефициент, което е допълнително потвърждение за приложимостта и ефективността на метода. Методът би могъл да има приложение и за изследване на вграждането на лекарствени вещества в други видове микро- и наночастици.

### Благодарности

Изследванията в тази работа са финансирани от Тракийски университет – проект № 05-МФ/2016.

### 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.
- Kitamura, K. 1998. "Second Derivative Spectrophotometric Determination of Partition Coefficients of Phenothiazine Derivatives between Human Erythrocyte Ghost Membranes and Water." *Talanta* 46 (6): 1433–38. doi:10.1016/S0039-9140(98)00014-9.
- Kitamura, Keisuke, Noriyuki Imayoshi, Takashi Goto, Hiroto Shiro, Takako Mano, and Yuko Nakai. 1995. "Second Derivative Spectrophotometric Determination of Partition Coefficients of Chlorpromazine and Promazine between Lecithin Bilayer Vesicles and Water." *Analytica Chimica Acta* 304 (1): 101–6. doi:10.1016/0003-2670(94)00566-5.
- 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.
- Poła, Andrzej, Krystyna Michalak, Anna Burliga, Noboru Motohashi, and Masami Kawase. 2004. "Determination of Lipid Bilayer/Water Partition Coefficient of New Phenothiazines Using the Second Derivative of Absorption Spectra Method." *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 21 (4): 421–27. doi:10.1016/j.ejps.2003.10.007.
- 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.
- Tacheva, Bilyana, Radostina Georgieva, and Miroslav Karabaliev. 2016. "Interactions of the Spin-Labeled Chloroethylnitrosourea SLCNUgly with Electrode-Supported Lipid Films." *Electrochimica Acta* 192: 439–47. doi:10.1016/j.electacta.2016.02.009.



- Takegami, Shigehiko, Keisuke Kitamura, Keiko Takahashi, and Tatsuya Kitade. 2002. "Partition of N-Monomethylated Phenothiazine Drugs to Phosphatidylcholine Bilayer Vesicles Studied by Second-Derivative Spectrophotometry." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91 (6): 1568–72. doi:10.1002/jps.10121.
- Тачева, Биляна, Бояна Първанова, Радостина Георгиева, Антоанета Желева, and Мирослав Карабалиев. 2017. "Сравнително Изследване На Взаимодействието На Лекарствени Вещества с Липозоми и с BSA-Наночастици." *Science & Technologies: Medical Biology Studies* VII (1): 211–18.
- Тачева, Биляна, Бояна Първанова, Радостина Георгиева, and Мирослав Карабалиев. 2017. "Метод За Електрохимично Изследване На Вграждането На Амфифилни Лекарствени Вещества в Липозоми." *Science & Technologies: Medical Biology Studies* VII (1): 201–10.