

Разработка новых подходов к компартмент-локализованной долговременной доставке фармакологических препаратов

Назаркина Ж.К.^{1*}, Челобанов Б.П.¹, Степанова А.О.¹, Карпенко А.А.²,
Лактионов П.П.^{1, 2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

* zha_naz@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: электроспиннинг; стенты с лекарственным покрытием; материалы для тканевой инженерии; сиролимус; паклитаксел; доставка лекарств; высвобождение лекарственных препаратов

Мотивация и цель: Поскольку сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают первое место среди всех причин смертности и второе место среди причин инвалидизации населения РФ [1], актуальной задачей является разработка материалов, использование которых в сердечно-сосудистой хирургии позволило бы повысить эффективность хирургического вмешательства в кратковременной и долговременной перспективе.

Методы и алгоритмы: Электроспиннинг (ЭС) является уникальной технологией, позволяющей получать полимерные волокна из растворов полимеров, толщиной от десятков нанометров до нескольких микрон. В раствор для ЭС можно вводить не только полимеры, но и лекарственные препараты, наночастицы и функциональные биомолекулы. Варьируя состав раствора для ЭС можно контролировать высвобождение лекарственных препаратов из скэффолдов. Методом ЭС были получены лекарственно-наполненные скэффолды на основе поликапролактона (ПКЛ). В качестве лекарственных препаратов использовали сиролимус (СРЛ) и паклитаксел (ПТХ), обладающие антипролиферативным действием. Для векторизации доставки лекарственных препаратов были получены скаффолды на основе поликапролактона, содержащие волокна, наполненные наночастицами активированного угля (АУ). Для этого использовали уголь марки АХ-21 после последовательного измельчения на шаровой и бусиновой мельницах [2]. Структура полученных скэффолдов была исследована при помощи оптической микроскопии, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС). Для исследования кинетики высвобождения препаратов были изготовлены скэффолды, содержащие радиоактивно меченные препараты. Изучено влияние деформации скэффолдов на высвобождение лекарств. Исследована био- и гемосовместимость полученных скэффолдов.

Результаты: Для изготовления лекарственно-наполненных скаффолдов в качестве базового полимера был использован поликапролактон, который характеризуется хорошими механическими характеристиками и биосовместимостью и нетоксичностью [3, 4]. Для улучшения гемосовместимости

в состав волокон добавляли человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) [4]. Было изготовлено и исследовано три типа скэффолдов: ПКЛ, ПКЛ/ЧСА и ПКЛ/ЧСА/ДМСО, содержащих СРЛ или ПТХ. Наиболее длительное высвобождение лекарств наблюдалось для скэффолда ПКЛ/ЧСА/ДМСО. В течение 27 суток из данного типа скэффолдов высвобождалось не более 80% лекарственного препарата, что говорит о перспективности использования таких скэффолдов для пролонгированной доставки лекарств. Раскрытие стента при его имплантации приводит к растяжению покрытия стента, что может оказывать влияние на структуру скэффолда и характер высвобождения лекарств. Было исследовано влияние деформации скэффолдов на высвобождение лекарственных препаратов. Показано, что растяжение скэффолда в одном направлении приводит к ориентации волокон матрикса в направлении приложенной силы, без образования разрывов и без изменения диаметра волокон. Показано, что СРЛ и ПТХ быстрее высвобождаются в плазму крови (ПК) человека, чем в фосфатный буфер (PBS). При инкубации скэффолдов с ПК в динамических условиях скорость высвобождения выше. Для всех типов скэффолдов растяжение не оказывает значимого влияния на кинетику высвобождения лекарств из скэффолдов. Это свидетельствует о том, что деформация скэффолдов при установке стентов не влияет на скорость высвобождения препаратов.

Исследована кинетика высвобождения СРЛ и ПТХ из стентов, покрытых скаффолдами состава ПКЛ/ЧСА/ДМСО через артериальную стенку в PBS и в ПК. Стенты с покрытиями устанавливали на баллоны-катетеры (рис. 1), вводили их в свежеексплатированную подвздошную артерию кролика, и исследовали высвобождение радиоактивного препарата через артериальную стенку. Полученные данные демонстрируют, что артериальная стенка эффективно удерживает лекарственные средства. ПТХ высвобождается через артериальную стенку в PBS быстрее, чем в плазму. СРЛ имеет схожую кинетику высвобождения в ПК и PBS. Не более 20 % ПТХ, и не более 10 % СРЛ потенциально способных высвободиться из матрикса, диффундирует через артерию в ПК в течение 24 ч, тогда как большая часть препарата накапливается в артериальной стенке.

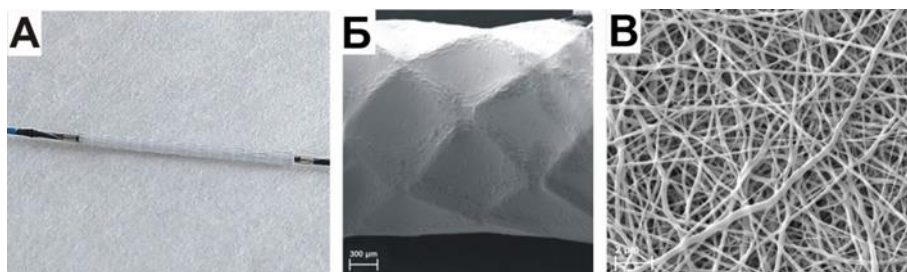


Рис. 1. Установленный на балон-катетер стент с покрытием ПКЛ/ЧСА/ДМСО/ПТХ, нанесенным методом электроспиннинга (А). Структура покрытия по данным СЭМ при увеличении 66× (Б), при увеличении 10000× (В)

Для векторизации доставки лекарственных препаратов в сосудистую стенку предлагается использовать скэффолды, содержащие несколько функциональных слоев: основной внешний (контактирующий со стенкой сосуда) слой, высвобождающий лекарственный препарат, и внутренний (ориентированный в

кровь) слой, содержащий наночастицы активированного угля и способный сорбировать лекарственный препарат. Сорбирующий слой необходим для уменьшения попадания лекарственного препарата в кровоток. Было исследовано 4 типа скэффолдов, изготовленных на основе ПКЛ, содержащих волокна (гомогенные и коаксиальные), наполненные наночастицами АУ. Показано, что кинетика связывания/высвобождения СРЛ из АУ-наполненных скэффолдов определяется составом волокон и отличается от кинетики, полученной при использовании свободного АУ. Показано, что клетки пупочной вены человека (HUVEC) и фибробласты десны человека (GF) адгезируют к скэффолдам на основе ПКЛ хуже, чем к культуральному пластику. Нагрузка волокон АУ не оказывает значительного влияния на адгезию и пролиферацию клеток, культивируемых на поверхности скэффолдов.

Для исследования гемосовместимости уголь-наполненных скэффолдов были выполнены тесты на гемолиз и адгезию тромбоцитов. Уровень гемолиза не превышал 1 %. Инкубация скэффолдов с обогащенной тромбоцитами плазмой показала, что адгезия тромбоцитов зависит от состава волокон. Минимальное количество прикрепившихся тромбоцитов наблюдалось для скэффолда с коаксиальными волокнами, в то время как для скэффолда, не содержащего частицы АУ, и скэффолда с гомогенными волокнами степень адгезии тромбоцитов была существенно выше. Таким образом, уголь-наполненный скэффолд с коаксиальными волокнами обладает повышенным атромбогенным потенциалом по сравнению с двумя другими скэффолдами.

Выводы: Предложены скэффолды на основе ПКЛ, в состав которых введены лекарственные средства. Исследована кинетика высвобождения лекарственных препаратов (паклитаксела и сиролимуза) из скэффолдов, в том числе при деформации. Независимо от состава волокон, растяжение скэффолдов не оказывает значимого влияния на кинетику высвобождения лекарств. Скэффолды на основе ПКЛ, содержащие ЧСА и ДМСО, являются наиболее перспективными в качестве покрытий для сосудистых стентов с длительным высвобождением лекарственных препаратов. Показано, что артериальная стенка эффективно удерживает лекарственные препараты. Накопление препарата в артериальной стенке способствует длительному поддержанию субцитотоксических концентраций лекарств в артериальной стенке и позволяют уменьшить дозу вводимых в покрытие стентов препаратов. Для решения проблемы вымывания лекарства током крови впервые было предложено использовать скэффолды, содержащие наполненный активированным углем барьерный слой. Показано, что АУ в составе барьерного слоя хорошо адсорбирует лекарственные средства, в том числе и в биологических жидкостях, при этом наполненные углем скаффолды не токсичны, хорошо совместимы с эукариотическими клетками и обладают хорошей гемосовместимостью. Скаффолды с уголь-наполненным слоем могут быть использованы для изготовления покрытий стентов, протезов сосудов, других имплантируемых трубчатых структур. Такое строение материала позволяет уменьшить расход лекарственных препаратов, уменьшить их системную доставку и повысить эффективность медицинских изделий.

Финансирование: Исследование поддержано бюджетным проектом по госзаданию (ГЗ 121031300042-1) и частично из средств НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина (ГЗ 121032300337-5).

New approaches of compartment-localized long-term drug delivery

Nazarkina Zh.^{1*}, Chelobanov B.¹, Stepanova A.¹, Karpenko A.², Laktionov P.^{1, 2}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

* zha_naz@niboch.nsc.ru

Key words: electrospinning; drug-eluting stents; materials for tissue engineering; sirolimus; paclitaxel; drug delivery; controlled drug release

Motivation and Aim: Cardiovascular diseases (CVD) occupy the first place among all causes of death and the second place among the causes of disability of the population of the Russian Federation [1]. An urgent task is to develop materials for cardiovascular surgery that would improve the effectiveness of surgical intervention in the short and long term.

Methods and Algorithms: Electrospinning (ES) is a unique technology that allows the production of polymer fibers from polymer solutions ranging in thickness from tens of nanometers to several microns. Not only polymers can be introduced into the ES solution, but also drugs, nanoparticles and functional biomolecules. By varying the composition of the ES solution, the release of drugs from scaffolds can be controlled. Using the ES method, drug-filled scaffolds based on polycaprolactone (PCL) were obtained. Sirolimus (SRL) and paclitaxel (PTX), which have an antiproliferative effect, were used as drugs. To vectorize drug delivery, PCL-based scaffolds containing fibers filled with activated carbon (AC) nanoparticles were obtained. For this purpose, activated carbon AX-21 was used after sequential grinding with ball and bead mills [2]. The structure of the obtained scaffolds was studied using optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Scaffolds containing radioactively labeled drugs were manufactured to study the kinetics of drug release. The effect of scaffold deformation on drug release has been studied. The bio- and hemocompatibility of the obtained scaffolds has been investigated.

Results: For the manufacture of drug-filled scaffolds, polycaprolactone was used as the base polymer, which is characterized by good mechanical characteristics and biocompatibility and non-toxicity [3, 4]. To improve hemocompatibility, human serum albumin (HSA) was added to the fiber composition [4]. Three types of scaffolds were manufactured and investigated: PCL, PCL/HSA and PCL/HSA/DMSO containing SPL or PTX. The longest drug release was observed for PCL/HSA/DMSO scaffold. Within 27 days, no more than 80 % of the drug was released from this type of scaffolds. This indicates the prospects of using such scaffolds for prolonged drug delivery. The stent installation leads to stretching of the stent coating, which can affect the scaffold structure and the drug release. The effect of scaffold deformation on drug release has been investigated. It is shown that the scaffold elongation leads to the orientation of the matrix fibers in the direction of the applied force, without the formation of breaks and without changing the diameter of the fibers. It has been shown that SRL and PTX are released faster into human blood plasma (BP) than into the phosphate buffer (PBS). When incubating scaffolds from a BP under dynamic conditions, the release rate is higher. For

all types of scaffolds, elongation has no significant effect on the drug release kinetics. This indicates that the deformation of scaffolds during the stent installation does not affect the rate of drug release.

The kinetics of the release of SRL and PTX from stents coated with PCL/HSA/DMSO scaffolds through the arterial wall in PBS and in BP have been studied. Coated stents were placed on balloon catheter (Fig. 1), injected into the freshly exposed iliac artery of a rabbit, and the release of a radioactive drug through the arterial wall was investigated. The data obtained demonstrate that the arterial wall effectively retains drugs. PTX is released through the arterial wall into PBS faster than into BP. SRL has similar release kinetics in BP and PBS. No more than 20% of the PTX, and no more than 10 % of the SRL released from the scaffolds, diffuses through the artery into BP within 24 hours, whereas most of the drug accumulates in the arterial wall.

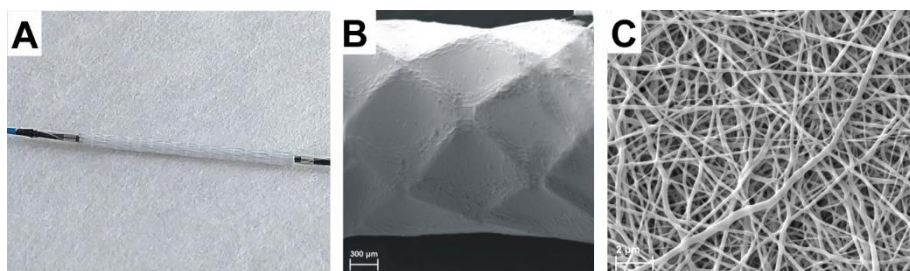


Fig. 1. An electrospun coated stent installed onto balloon catheter before (A). The structure of the coating according to the SEM data at an increase of $66\times$ (B), at an increase of $10000\times$ (C)

To vectorize drug delivery into the vascular wall, it is proposed to use scaffolds containing several functional layers: the main outer (in contact with the vessel wall) drug releasing layer, and the inner (blood-oriented) AC-containing layer capable of drug adsorbing. The adsorbing layer is necessary to reduce the drug penetration into the bloodstream. 4 types of PCL-based scaffolds containing homogeneous and coaxial AC-filled fibers were studied. It is shown that the kinetics of the binding/release of CRL from AC-filled scaffolds is determined by the fiber composition and differs from the kinetics obtained using free AC nanoparticles. It has been shown that human umbilical vein cells (HUVEC) and human gingival fibroblasts (GF) adhere to PCL-based scaffolds worse than to tissue culture plastic. The load of fibers with AC nanoparticles has no significant effect on the adhesion and proliferation of cells cultured on the surface of scaffolds.

To study the hemocompatibility of AC-filled scaffolds, tests for hemolysis and platelet adhesion were performed. The hemolysis level did not exceed 1%. Incubation of scaffolds with platelet-rich plasma showed that platelet adhesion depends on the fiber composition. The minimum number of attached platelets was observed for scaffold with coaxial fibers, while for scaffold without AC particles and scaffold with homogeneous fibers, the degree of platelet adhesion was significantly higher. Thus, a AC-filled scaffold with coaxial fibers has an increased athrombogenic potential compared to the other two scaffolds.

Conclusion: PCL-based scaffolds contain drugs (paclitaxel and sirolimus) have been proposed. Drug release kinetics from scaffolds, including during deformation, has been studied. Regardless of the fiber composition, scaffold elongation has no significant effect on the drug release kinetic. PCL-based scaffolds containing HSA and DMSO are the

most promising coatings for vascular stents with long-term drug release. It has been shown that the arterial wall effectively retains drugs. The drug accumulation in the arterial wall contributes to the long-term maintenance of subcitotoxic concentrations of drugs in the arterial wall and allows reducing the dose of drugs added into the stent coating. To solve the problem of drug washing out by blood flow, it was proposed to use scaffolds containing a barrier layer filled with activated carbon. It has been shown that AC in the barrier layer adsorbs drugs well, including in biological fluids, while carbon-filled scaffolds are non-toxic, well compatible with eukaryotic cells and have good hemocompatibility. Scaffolds with AC-filled layer can be used for the manufacture of stent coatings, vascular prostheses, and other implantable tubular structures. This structure of the material makes it possible to decrease the drug concentration, reduce their systemic delivery and increase the effectiveness of medical devices.

Funding: The study is supported Russian State-funded budget project of ICBFM SB RAS number 121031300042-1 and partially supported by the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation number 121032300337-5.

Список литературы/References

1. Здравоохранение в России: Стат. сб. Росстат. М., 2023 [Healthcare in Russia: Stat. sat. Rosstat. Moscow, 2023 (in Russian)]
2. Nazarkina Z.K., Savostyanova T.A., Chelobanov B.P. et al. Activated carbon for drug delivery from composite biomaterials: the effect of grinding on sirolimus binding and release. *Pharmaceutics*. 2022;14(7):1386. doi 10.3390/pharmaceutics14071386
3. Mirbagheri M.S., Mohebbi-Kalhari D., Jirofti N. Evaluation of mechanical properties and medical applications of polycaprolactone small diameter artificial blood vessels. *Int J Basic Sci Med*. 2017;2:58-70
4. Chernonosova V.S., Kvon R.I., Stepanova A.O., Larichev Y.V., Karpenko A.A., Chelobanov B.P., Kiseleva E.V., Laktionov P.P. Human serum albumin in electrospun PCL fibers: structure, release, and exposure on fiber surface. *Polym Adv Technol*. 2017;28:819-827