

МЕМБРАННАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ, ВЫЗВАННАЯ ПЕРЕМЕННЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ, В МАГНИТОЛИПОСОМАХ ЭРИТРОМИЦИНА: ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

© 2021 г. Б.М. Салах*, М Ради**, М. Абдель-Халим***, Х.М. Фахми****, Н.С. Эль-Дин*, М.Х. Габер****, *****

*Физический факультет Немецкого университета в Каире, Каир, Египет

**Отдел фармацевтических технологий Немецкого университета в Каире, Каир, Египет

***Отдел фармацевтической химии Немецкого университета в Каире, Каир, Египет

****Факультет науки, Каирский университет, Гиза, Египет

*****Инженерный факультет Британского университета в Египте (BUE), Каир, Египет

E-mail: bassantmoustapha@gmail.com

Поступила в редакцию 11.03.2020 г.

После доработки 11.03.2020 г.

Принята к публикации 13.05.2020 г.

Антибиотикоустойчивость является серьезной проблемой, стоящей перед человечеством и возрастающей с каждым годом из-за чрезмерного или неправильного использования антибиотиков, что ведет к развитию новых механизмов лекарственной устойчивости бактерий. Для данного исследования были разработаны магнитолипосомы, нагруженные препаратом эритромицина. Их подвергли воздействию переменного магнитного поля (5 и 15 мТл, 100 кГц) в течение 30 мин, чтобы проверить влияние поля на скорость высвобождения лекарственного средства за пределы сопротивляемости бактерий. Было показано повышение температуры на 4 и 24°C в случае воздействия на инкапсулированные эритромицином магнитолипосомы переменным магнитным полем в 5 и 15 мТл соответственно. Кроме того, наблюдалось увеличение количества высвобожденного эритромицина (0.83 ± 0.1 мкг/мл и 1.33 ± 4 мкг/мл при воздействии в 5 и 15 мТл соответственно) по сравнению с контролем (0.24 ± 0.06 мкг/мл). Воздействие переменного магнитного поля на инкапсулированный в магнитолипосомы эритромицин ускоряло скорость его высвобождения из-за механического воздействия на наночастицы. Результаты позволяют предположить, что можно запускать и контролировать высвобождение лекарств, совмещая целевую систему доставки лекарств с нанотехнологиями и магнитным полем. При увеличении интенсивности переменного магнитного поля скорость высвобождения значительно возрастала.

Ключевые слова: переменное магнитное поле, высвобождение лекарств, доставка лекарств, эритромицин, магнитолипосомы.

DOI: 10.31857/S0006302921020125

Употребление лекарства всегда является компромиссом между его терапевтическим эффектом и побочными эффектами. Липосомные системы доставки лекарств позволяют не только доставлять лекарства в более высоких концентрациях, но и воздействовать на конкретные клетки или органы [1]. Следовательно, использование липосом в качестве контролируемой целевой системы доставки лекарств связано с замедленным высвобождением капсулированных лекарств [2] в

сочетании с длительным периодом циркуляции. Контроль проницаемости липосомной мембраны и избегание, таким образом, нецелевого высвобождения лекарств должны уменьшать негативные побочные эффекты свободного движения молекул лекарств [3].

Новые липосомы были разработаны для обеспечения разумного лечения организма человека путем высвобождения инкапсулированного содержимого в ответ на различные раздражители, такие как температура, pH, свет, ультразвук, магнитное поле и так далее [2]. Такие специфические стимулы используются в качестве движущей силы в механизмах высвобождения лекарств, осно-

Сокращения: ПМП – переменное магнитное поле, ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия, СПЖХ – сверхпроизводительная жидкостная хроматография.

ванных на взаимодействии стимулов и липосом [4]. Магнитно-срабатывающий механизм стал одной из наиболее эффективных стратегий в качестве стимула высвобождения и точного нацеливания [5].

При уменьшении размеров материалов до наноразмерного диапазона их уникальные и интересные физические и химические свойства могут быть улучшены [6], что вдохновляет на универсальный дизайн и захватывающие разработки традиционных и новых наноразмерных материалов для биомедицинских применений [7, 8]. Один из таких примеров – наночастицы оксида железа. Поскольку как липосомы, так и наночастицы оксида железа одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA – Food and Drug Administration), их комбинация может применяться в медицинских целях [9, 10]. Помимо адресной доставки самих липосом, контролируемое высвобождение лекарств из липосом является еще одним важным предметом изучения для их терапевтического применения [11, 12].

Контроль профиля высвобождения лекарств является одним из достижений систем доставки лекарств [2, 13]. Система доставки с участием магнитных наночастиц может помочь контролировать способность высвобождения лекарств в липосомах [14], которые имеют различную структуру, в первую очередь, определяемую структурой липидного бислоя или мембраной, которая окружает водный объем [15]. Варьирование структуры мембраны может создать огромное количество липосом с различными характеристиками и применениями [15].

Многие препараты подобного типа действия имеют серьезные побочные эффекты и токсичность, либо обладают очень высокой антимикробной активностью, но слабой фармакокинетикой и фармакодинамикой, которые ограничивают их использование. Инкапсуляция в липосомы улучшает доставку лекарственного средства к месту высвобождения [16–18].

Эритромицин, использованный в настоящем исследовании, являясь модельным относительно гидрофобным препаратом, он представляет собой антибиотик, который ингибирует синтез незаменимых белков в восприимчивых бактериях и используется при лечении инфекций горла, пневмонии, в дополнение к лечению широкого спектра бактериальных инфекций. Среди болезнетворных агентов, чувствительных к эритромицину, – *Staphylococcus aureus*, многие виды *Streptococcus*, виды *Mycoplasma*, *Legionella pneumophila* (бактерия, вызывающая болезнь легионеров) и *Corynebacterium diphtheriae* (возбудитель дифтерии). Как правило, эритромицин обладает низкой цитотоксичностью, однако было задоку-

ментировано, что он вызывает желудочно-кишечные проблемы, а также токсичен для печени из-за его нестабильности и химической конверсии в кислых условиях [19, 20]. Пожилые пациенты часто неспособны переносить активность перистальтики кишечника под воздействием препарата, тогда как дети считают совершенно неприемлемым неприятный вкус. Устойчивость к антибиотикам растет с угрожающей скоростью, что может быть обусловлено ростом потребления антибиотиков [21]. Для устранения устойчивости к антибиотикам были разработаны некоторые подходы, такие как разработка новых соединений, ингибирование их устойчивости к ферментам. Нанотехнологии могут играть важную роль в предотвращении устойчивости к антибиотикам путем избегания эффлюксных насосов и с помощью некоторых других механизмов [22, 23]. Магнитолипосомы, содержащие эритромицин, могут быть потенциальной системой наноносителей, которая может служить возможным решением для преодоления устойчивости к антибиотикам.

Расширенную регуляцию активности высвобождения липосомного лекарственного средства можно получить с помощью переменного магнитного поля (ПМП) [24]. ПМП может быть стимулом для запуска высвобождения лекарственного средства из магнитолипосомы [12, 25]. Кроме того, электромагнитное поле при дистанционном срабатывании наночастиц улучшает проницаемость фосфолипидной мембраны [25]. Авторы работы [26] использовали DOX-инкапсулированные магнитолипосомы и подвергали их воздействию высокочастотного ПМП (≈ 1 МГц). Выделенное тепло привело к высвобождению препарата из магнитолипосом [18, 26, 27]. В то же время в работе [28] авторы продемонстрировали усиленное высвобождение декстрана путем применения низкочастотного ПМП к магнитным коллагеновым нанокомпозитам. Авторы работы [11] продемонстрировали, что воздействие ПМП неинвазивно ведет к нагреву внедренных наночастиц оксида железа и вызывает высвобождение лекарственного средства из термочувствительных липосом у крыс.

Цель настоящей работы состоит в том, чтобы исследовать роль ПМП в иницировании действия наночастиц для ускорения высвобождения лекарственного средства из компартмента нановезикул, а также сравнить результаты воздействия на магнитолипосомы ПМП одинаковой частоты, но различной низкой интенсивности.

МЕТОДЫ

Приготовление магнитных наночастиц (Fe_3O_4). Магнитные наночастицы были синтезированы путем щелочного соосаждения с использованием

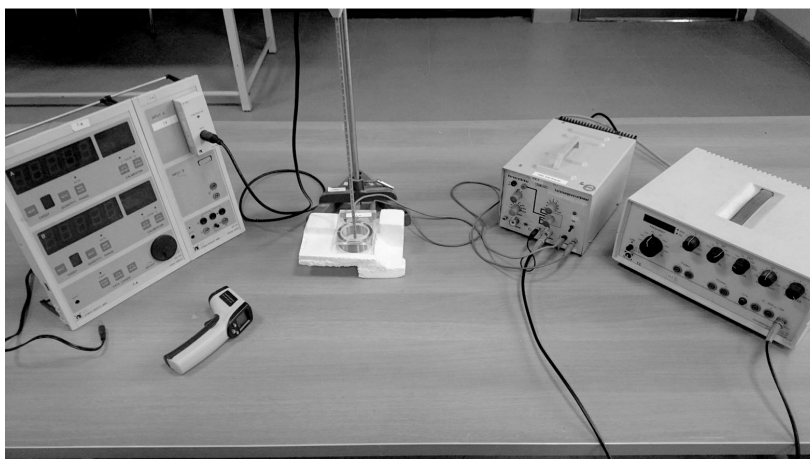


Рис. 1. Система воздействия переменным магнитным полем.

метода, описанного в работе [29]. Раствор, содержащий 0.07 моль/л Fe^{2+} и 0.14 моль/л Fe^{3+} , механически перемешивали (1000 об/мин) и нагревали до $80^{\circ}C$, затем добавляли к 50 мл NH_4OH и раствор перемешивали в течение 40 мин. После этого раствор оставляли для охлаждения при температуре окружающей среды. Затем магнитные частицы отделяли центрифугированием при 6000 об/мин. После промывали дистиллированной водой с последующей обработкой ультразвуком на ультразвуковой водяной бане в течение 30 мин.

Получение инкапсулированных эритромицином липосом и инкапсулированных эритромицином магнитолипосом холодным методом. Этосомы были получены в соответствии с методом, предложенным в работе [30], с простыми модификациями. Фосфатидилхолин (ФХ) (80 мг) из соевых бобов, 10 мг эмульгатора (Цетеарет-25) и 10 мг эритромицина растворяли в этаноле (20% по объему) и нагревали до $30 \pm 1^{\circ}C$ в закрытом сосуде на водяной бане. Дистиллированную воду, предварительно нагретую до $30 \pm 1^{\circ}C$, медленно добавляли тонкой струей к вышеуказанному раствору липида в этаноле при непрерывном перемешивании с использованием магнитной мешалки при 700 об/мин в течение 30 мин, затем хранили при $4^{\circ}C$. Что касается нановезикул эритромицина с

магнитными наночастицами, процедура была той же самой, что и выше, за исключением того, что магнитные наночастицы, диспергированные в дистиллированной воде, добавляли к этанольному раствору фосфатидилхолина, эмульгатора и эритромицина. Полученные нановезикулы обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой ванне с водяными банями в течение 30 мин [31].

Исследование приготовленных композиций. *Определение распределения по размерам.* Размер приготовленных композиций анализировали методом динамического рассеяния света с использованием Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments ZS, Великобритания).

Просвечивающая электронная микроскопия липосом (ПЭМ). Для определения формы синтезированных липосом использовали просвечивающий электронный микроскоп Jeol-2100 (Jeol, Япония).

Эффективность захвата. Инкапсулированную эритромицином липосому и инкапсулированную эритромицином магнитолипосому центрифугировали при 15889 g, $4^{\circ}C$ в течение 90 мин и отделяли надосадочную жидкость. Абсорбцию центрифугата измеряли методом жидкостной хроматографии с масс-спектроскопией. Следующее уравнение было использовано для расчета эффективности инкапсуляции.

$$EE\% = \frac{\text{Все лекарство} - \text{Свободное лекарство}}{\text{Все лекарство}} \times 100.$$

Система воздействия переменным магнитным полем. Как показано на рис. 1, система воздействия переменным магнитным полем состояла из круглой магнитной катушки ($N = 200$, $r = 3$ см,

$L = 0.35$ мГн), которая была подключена к генератору сигналов DDS-частотного генератора серии MHS-5200A и усилителю мощности NEVA Dr. Vatter GmbH & Co. Тип 7220 № 384. Сенсоры

Cassy, тесламетр и инфракрасный термометр были использованы для оценки напряженности магнитного поля и температуры соответственно.

Температурные эксперименты. Частотный генератор был установлен на 100 кГц в течение 10 мин, чтобы подтвердить стабильность магнитного поля, генерируемого в катушке. Затем кювету объемом 1.5 мл, заполненную инкапсулированными эритромицином магнитолипосомами, помещали в центр катушки, которая генерирует ПМП. Кювету изолировали пенопластовой оболочкой, чтобы не было прямого контакта с проводами катушки. Это необходимо для того, чтобы убедиться, что повышение температуры в образцах происходит из-за магнитной энергии, передаваемой ПМП магнитолипосоме, а не из-за проводимости от теплового внутреннего сопротивления проводов катушки или любых других изменений температуры окружающей среды. Повышение температуры непрерывно контролировали в течение 30 мин с использованием инфракрасного термометра, расположенного точно над кюветой. Температуру регистрировали каждую минуту. Каждый эксперимент проводили трижды, представленные данные представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение.

***In vitro* исследование высвобождения инкапсулированной эритромицином липосомы и инкапсулированной эритромицином магнитолипосомы до и после воздействия переменного магнитного поля.** Наносuspензию с магнитными наночастицами (0.5 мл) помещали в диализный мешок (MWCO: 12000–14000), наполненный дополнительно 5 мл фосфатно-солевого буфера, pH 7.4. Был взят 1 мл образцов. Образцы анализировали на эритромицин методом ЖХ/МС [1]. Для каждого испытания были подготовлены два набора образцов и подвергнуты воздействию ПМП с частотой 100 кГц, но с различной интенсивностью — 5 и 15 мТл соответственно, в течение получаса, затем проводили исследования высвобождения *in vitro*.

Были созданы две группы инкапсулированных эритромицином магнитолипосом: группа А, которая была контрольной группой, не подвергавшейся воздействию ПМП, и группа В, подвергавшаяся воздействию 5 мТл ПМП в течение 30 мин.

Приблизительно 1 мл каждого образца липосом отбирали через определенные интервалы времени в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 24 ч и заменяли равными объемами свежего фосфатно-солевого буфера буфера. Одновременно были созданы две другие группы инкапсулированных эритромицином магнитолипосом для воздействия ПМП 15 мТл с той же частотой.

Условия эксперимента с применением сверхпроизводительной жидкостной хроматографии (СПЖХ-МС/МС). СПЖХ-МС/МС для определения эритромицина проводили с использовани-

ем дифенгидрамина в качестве внутреннего эталона. Анализы были получены на системе Waters ACQUITY Xevo TQD, которая состояла из хроматографической системы ACQUITY UPLC H-Class и трехкврупольного масс-спектрометра XevoTQD с интерфейсом электрораспылительной ионизации (ESI) (Waters Corp., Milford, США). Для разделения анализов использовали колонку Aquity UPLC VEN C18 50 \times 2.1 мм (размер частиц 1.7 мкм) (Waters, Wexford, Ирландия). Работу системы и сбор данных контролировали с помощью программного обеспечения MassLynx 4.1 (Waters, Milford, США). Все данные были обработаны с помощью программы количественной оценки TargetLynx (Waters, Milford, США). Градиентное элюирование при скорости потока 0.2 мл/мин проводили для хроматографического разделения с использованием 0.1% муравьиной кислоты в воде (А) и 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (Б). Градиент работал следующим образом: 0 мин, 95% А, 5% Б; 1.0 мин, 5% А, 95% Б; 3 мин, 5% А, 95% Б; 4 мин, 95% А, 5% Б; 6 мин, 95% А, 5% Б. Объем инъекции составлял 10 мкл, выполненный путем частичной инъекции в петлю с использованием переполнения иглы в качестве техники инъекции. Температура колонки была установлена на 40°C. В качестве газа для десольватации и для конуса использовали азот при скорости потока 800 и 1000 мл/ч соответственно. Аргон использовали в качестве «collision gas» при давлении приблизительно $3.67 \cdot 10^{-3}$ мбар. Оптимальные параметры МС были следующими: капиллярное напряжение 3.9 кВ, радиочастотное напряжение линзы 2.5 В, температура источника 150°C и температура десольватационного газа 300°C. Напряжение на конусе составляло 23 и 38 В для эритромицина и дифенгидрамина соответственно. Резервный источник энергии работал в положительном режиме. Количественную оценку проводили с использованием множественного мониторинга реакций переходов m/z 734.55 $>$ 158.15 с энергией столкновения 32 В для эритромицина и m/z 256.14 $>$ 167.04 с энергией столкновения 10 В для дифенгидрамина соответственно. Время задержки автоматически устанавливалось программным обеспечением MassLynx 4.1.

Приготовление образцов серийного разведения эритромицина. Для калибровки готовили исходный раствор с концентрацией 1 мг/мл эритромицина в метаноле и разбавляли центрифугатом чистых липосом/магнитолипосом или фосфатно-солевым буфером для получения рабочих растворов с концентрацией 0.1, 0.3, 0.7, 2, 5 и 10 мкг/мл. Готовили исходный раствор (1 мг/мл) дифенгидрамина (внутренний эталон) в метаноле, затем разбавляли до 1 мкг/мл. Образцы калибровочной кривой готовили путем добавления 100 мкл 1 мкг/мл внутреннего эталона к 1 мл раствора эритромицина в каждом из разведений. Образцы

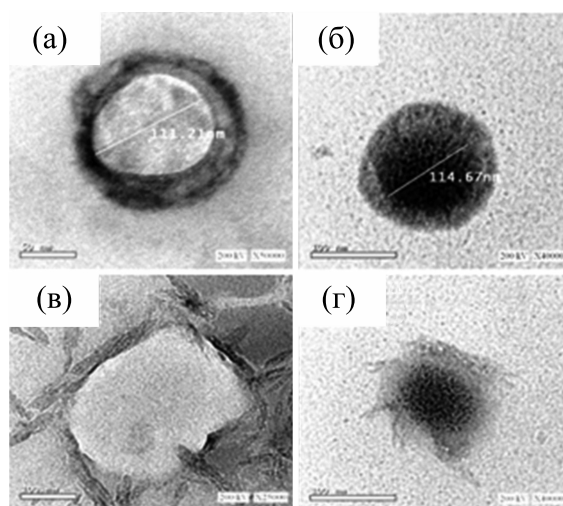


Рис. 2. ПЭМ-изображения липосом (а), магнитолипосом (б), липосом после обработки ПМП (в) и магнитолипосом после обработки ПМП (г).

калибровочной кривой фильтровали с использованием мембранных фильтров 0.22 мкм (Waters, США) и анализировали с использованием описанного выше метода СПЖХ-МС/МС.

Проверка метода. Впервые предложенный метод СПЖХ-МС/МС был утвержден в соответствии с руководящими принципами ИСН в следующем контексте: специфичность, линейность, порог чувствительности, предел количественного определения, воспроизводимость (в разные дни и внутрисуточная) и достоверность.

Порог чувствительности был определен как концентрация образца, дающая ответ, в три раза превышающий базовый шум. Предел количественного определения рассчитывали, как концентрацию образца, дающего сигнал, в десять раз превышающий базовый шум. Воспроизводимость в течение суток определяли в течение одних суток путем анализа трех образцов калибровочной кривой. Межсуточную воспроизводимость определяли в течение трех суток подряд при одинаковых концентрациях. Достоверность определяли путем введения четырех различных концентраций, которые не использовались при построении калибровочной кривой (образцы для контроля качества: 0.2, 0.5, 1, 3 мкг/мл), точность метода определяли как абсолютное значение отношения среднего от найденных значений образцов калибровочной кривой к их теоретическим значениям, выраженные в процентах. Критерии приемлемости данных включали точность в пределах $\pm 15\%$ и точность в пределах $\pm 15\%$ отклонения (85–115%) от номинального.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование приготовленных композиций. Средний размер приготовленных композиций липосом. Рассчитанный средний размер частиц различных композиций составлял 254 ± 10 нм для липосом, инкапсулированных эритромицином, и 473 ± 40 нм для магнитолипосом, инкапсулированных эритромицином. Распределение индекса полидисперсности составляло 0.35 и 0.32 для инкапсулированных эритромицином липосом и инкапсулированных эритромицином магнитолипосом соответственно.

Зета-потенциал. Было установлено, что средний зета-потенциал для инкапсулированных эритромицином липосом составляет 47.9 ± 0.35 мВ, тогда как для инкапсулированных эритромицином магнитолипосом он составляет 47.5 ± 0.85 мВ.

Эффективность захвата. Эффективность загрузки лекарственного средства составляла $87.9 + 2.2\%$ для инкапсулированной эритромицином липосомы и $97.8 + 1.5\%$ для инкапсулированной эритромицином магнитолипосомы, что указывает на высокую эффективность инкапсуляции лекарственного средства.

Подтверждение влияния переменного магнитного поля морфологически. Изменение морфологии простых липосом и магнитолипосом наблюдалось на изображениях, полученных с помощью ПЭМ, с размером частиц 111.21 нм и 114.67 нм соответственно (показаны на рис. 2, по одной частице в поле зрения). Таким образом, подтверждается успешное приготовления липосом и магнитолипосом, захват магнитных наночастиц и разрыв композитов после обработки ПМП.

Температурные результаты. Магнитолипосомы, подвергшиеся воздействию ПМП 5 мТл при

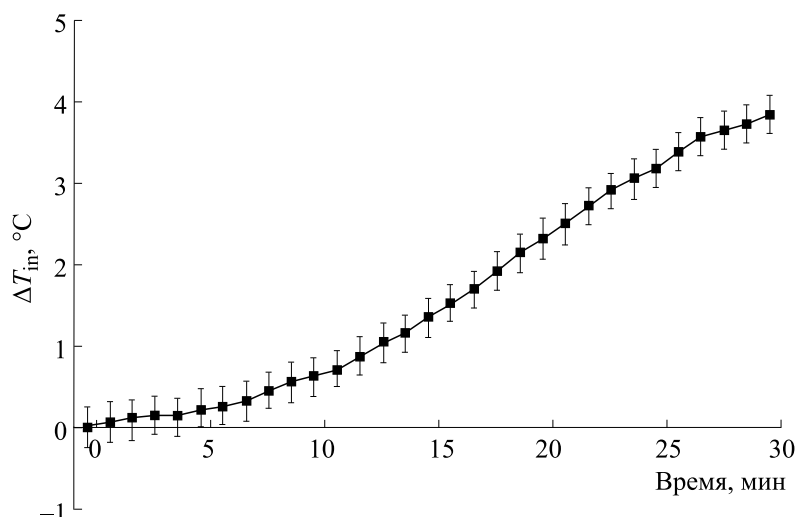


Рис. 3. Повышение разницы в температуре магнитолипосомы при увеличении продолжительности воздействия переменного магнитного поля при 100 кГц, 5.6 мТл.

100 кГц в течение получасового времени воздействия, демонстрировали повышение температуры с 23 до 27°C (почти 4°C) (рис. 3). Для воздействия ПМП 15 мТл повышение температуры — с 30 до 55°C (почти 24°C) (рис. 4).

Результаты высвобождения препарата *in vitro*. Измерения эритромицина с помощью метода СПЖХ-МС/МС. Впервые разработанный метод СПЖХ-МС/МС определения эритромицина был выполнен с использованием дифенгидрамина в качестве внутреннего эталона. Количественное определение было выполнено с использованием мониторинга множественных реакций переходов m/z 734.55 > 158.15 с энергией столкновения 32 В для эритромицина, как показано на рис. 5, и

m/z 256.14 > 167.04 с энергией столкновения 10 В для дифенгидрамина, как показано на рис. 6 соответственно.

Предложенный метод СПЖХ-МС/МС был подтвержден с точки зрения линейности, специфичности, порога чувствительности, предела количественного определения, воспроизводимости (однодневной и многодневной) и достоверности. Отклик каждого образца калибровочной кривой (y) наносили на график в зависимости от его концентрации (x). Получено уравнение линейной корреляции $y = 1.204x - 0.021$ с $R^2 = 0.994$. Обнаружено, что порог чувствительности составляет 0.5 нг/мл, а предел количественного опреде-

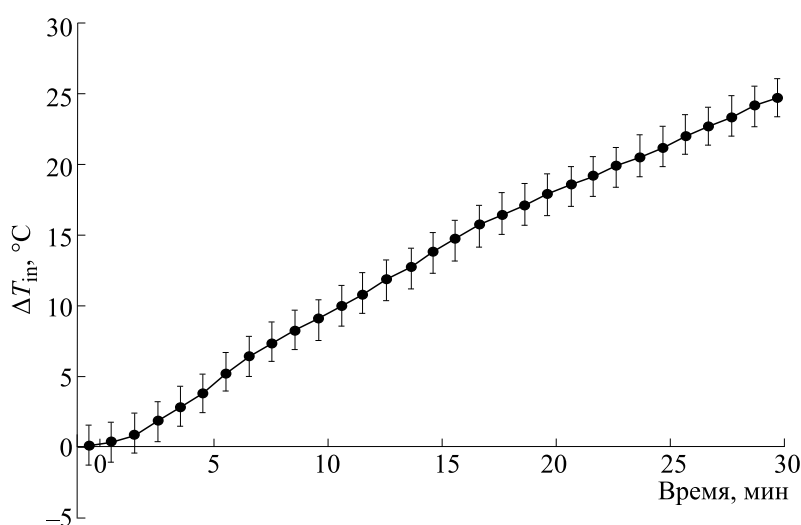


Рис. 4. Повышение разницы в температуре магнитолипосомы за счет увеличения продолжительности воздействия переменного магнитного поля при 100 кГц, 15 мТл.

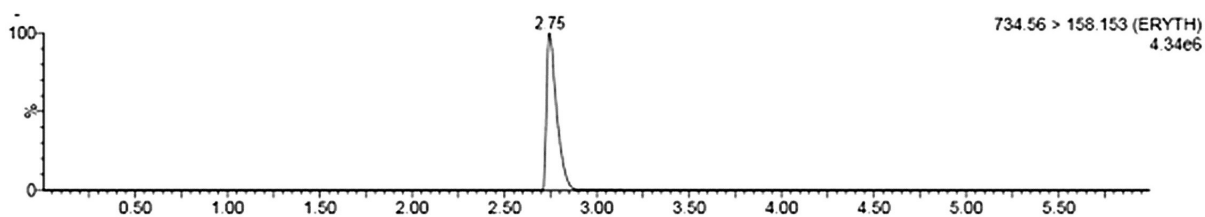


Рис. 5. СПЖХ-МС/МС-хроматограмма эритромицина в режиме множественного мониторинга реакций.

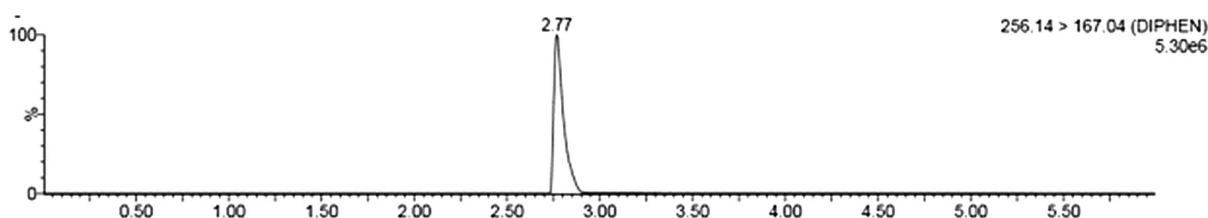


Рис. 6. СПЖХ-МС/МС-хроматограмма дифенгидрамина в режиме множественного мониторинга реакций.

ления – 1.6 нг/мл. Суточная повторяемость, оцениваемая как % КП, варьировала от 0.90 до 4.71%, тогда как для межсуточной воспроизводимости % КП варьировал от 0.55% до 4.94%. Для оценки точности были подготовлены четыре образца контроля качества, и измеренный с этой целью процент выхода составлял от 92 до 101%.

Выход препарата in vitro после воздействия переменного магнитного поля с различной интенсивностью. Магнитолипосомы, подвергшиеся воздействию ПМП 5 мТл, 100 кГц в течение получасового времени воздействия, продемонстрировали высвобождение эритромицина 0.83 ± 0.1 мкг/мл по отно-

шению к 0.24 ± 0.06 мкг/мл в контрольной группе через 24 ч после воздействия (рис. 7). В то же время у магнитолипосом, подвергшихся воздействию ПМП 15 мТл, эритромицин высвобождался с содержанием $(1.33 \pm 0.04) \cdot 10^{-7}$ мкг/мл по отношению к 0.24 ± 0.06 мкг/мл в контрольной группе через 24 ч после воздействия (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Магнитолипосомы тщательно оценивались с точки зрения контролируемого высвобождения лекарств. Движение магнитных наночастиц

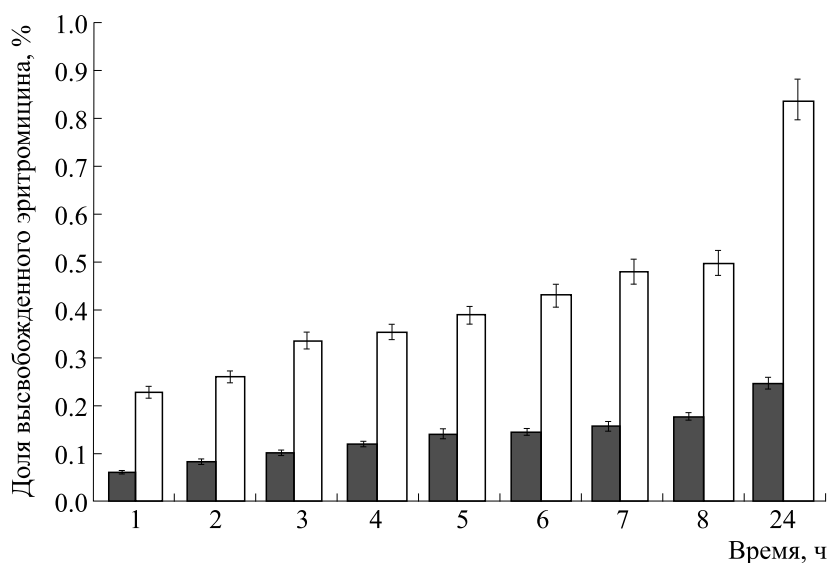


Рис. 7. Разница в высвобождении лекарственного средства из не подвергавшихся воздействию (темные столбики) и экспонированных в 5 мТл ПМП магнитолипосом (светлые столбики) в различные интервалы времени.

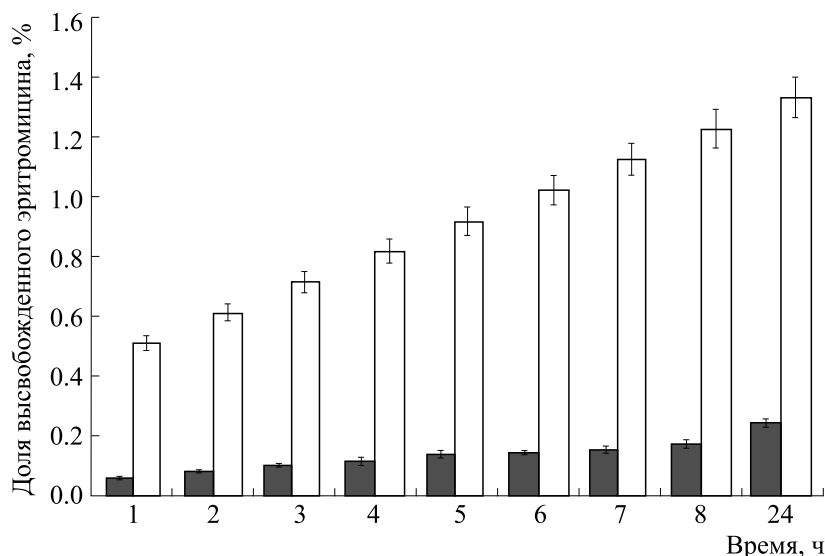


Рис. 8. Разница в высвобождении лекарственного средства из не подвергавшихся воздействию (темные столбики) и подвергавшихся воздействию 15 мТл магнитолипосом (светлые столбики) в течение 8 ч, а также через 24 ч.

вследствие воздействия магнитного поля достаточной интенсивности и частоты действует как основной триггер для высвобождения лекарств [3, 32]. Описанный здесь эффект проницаемости свидетельствует о том, что изменения в мембранах магнитолипосом могут быть вызваны воздействием относительно слабых магнитных полей при температурах, близких или равных T_c .

Наши ранние результаты показывают, что для изменения проницаемости бислоя достаточно на поверхность липидной мембраны приложить синусоидальное магнитное поле 100 кГц (пик в 5 мТл). ПЭМ-изображения также показали, что воздействие магнитного поля привело к изменениям в целостности поверхности липосом и даже к фрагментации мембраны, что доказывает заметное влияние ПМП на систему высвобождения лекарственного средства в присутствии магнитных наночастиц.

Магнитолипосомы были исследованы в качестве возможных носителей для систем доставки лекарств, зависящих от магнитного поля. Магнитолипосомы формировались из суперпарамагнитных гидрофобных наночастиц на основе оксида железа, заключенных в двухслойную липидную мембрану этих везикул [33, 34]. Наши эксперименты с применением атомно-силовой микроскопии показали, что присутствие гидрофобных наночастиц, встроенных в липидную мембрану, приводит к общему усилению жесткости и увеличению морфологической неоднородности, что должно способствовать механическому разрыву магнитолипосом во внешнем переменном магнитном поле низкой интенсивности. Чтобы подтвердить этот вывод, мы провели экс-

перименты по высвобождению эритромицина при наличии и отсутствии магнитного поля при комнатной температуре из магнитолипосом, замороженных пассивно и дистанционно.

Повышение температуры непрерывно отслеживалось каждую минуту в течение 30 мин. Повышение температуры почти на 4°C указывает на процесс прироста тепла (рис. 7). Способность магнитных наночастиц нагреваться зависит от характеристик магнитных частиц, таких как размер, намагниченность насыщения, когда выделяется тепло в результате потери гистерезиса, броуновской релаксации или релаксации по Нелю на основе размера частиц и частоты ПМП [12, 25].

Высвобождение отслеживалось в предположении о полном механическом разрыве магнитолипосом, который также визуализировали с помощью ПЭМ. Эритромицин высвобождался в количестве 0.83 ± 0.1 мкг/мл по отношению к 0.24 ± 0.06 мкг/мл в контрольной группе через 24 ч после воздействия. Это существенное высвобождение эритромицина из магнитных везикул, подверженных воздействию поля, по сравнению с неэкспонированными, происходит из-за воздействия механического воздействия и тепла, выделяемого липидным бислоем. Использование поля с частотой 100 кГц вызывает вращение и вибрацию частиц оксида железа, которые создают механические силы, вызывающие деформацию в фосфолипидной мембране липосомы.

Основная тенденция, которая вытекает из наших данных, говорит о том, что в наших экспериментальных условиях при воздействии 5 мТл высвобождение лекарственного средства происходит через разрыв магнитолипосом, вызванный

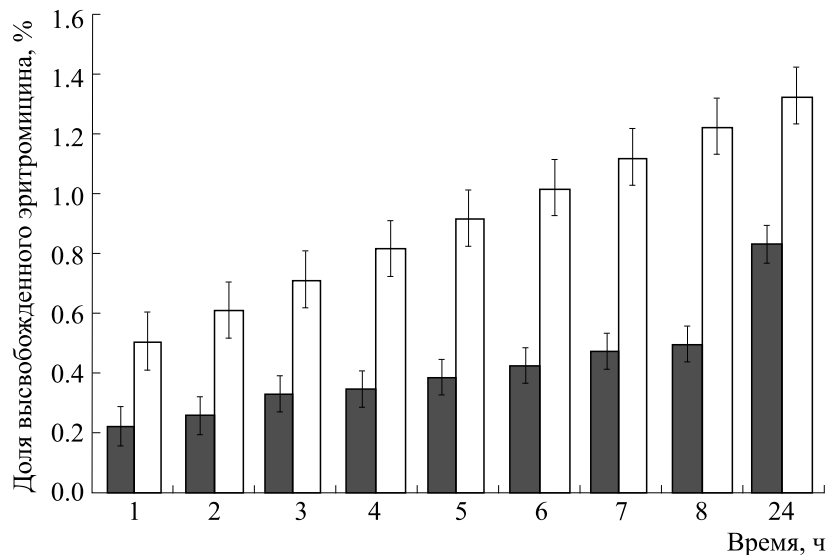


Рис. 9. Сравнение высвобождения эритромицина из магнитолипосом, подвергавшихся воздействию 5 и 15 мТл ПМП в течение 8 ч, а также через 24 ч.

механической вибрацией магнитных наночастиц, а не через локальный нагрев магнитной наночастицы. Таким образом происходит активация мембранной проницаемости, как наблюдали авторы работы [35].

Чтобы подтвердить влияние ПМП на контролируемое высвобождение лекарственного средства из магнитолипосом, высвобождение инкапсулированного эритромицина осуществляли в различных условиях путем увеличения напряженности магнитного поля до 15 мТл, где повышение температуры непрерывно контролировали ежеминутно до 30 мин. Эритромицин высвобождался с содержанием $(1.33 \pm 0.04) \cdot 10^{-7}$ мкг/мл по отношению к 0.24 ± 0.06 мкг/мл в контрольной группе через 24 ч после воздействия. Это повышение температуры на почти 24°C (рис. 8) сопровождало процесс получения тепла, указывая на то, что поглощение энергии электромагнитного поля может привести к новой конфигурации фосфолипида, что, в свою очередь, может привести к изменениям проницаемости липидной мембраны.

Сравнение данных по высвобождению эритромицина при воздействии 5 и 15 мТл при одной и той же частоте подчеркивает прямо пропорциональную взаимосвязь между магнитной энергией, передаваемой магнитолипосом переменным генерируемым электромагнитным полем, и проницаемостью мембраны.

Таким образом, свойства триггерного высвобождения ПМП продемонстрировали, что высво-

буждение нагрузки из магнитолипосом под действием ПМП было обусловлено контролируемым механическим приведением в действие магнитных наночастиц с помощью ненагревающего магнитного поля, что дает возможность преодолеть недостаток включения нагрева (рис. 7, 8) и показывает заметную разницу в высвобождении эритромицина из магнитолипосом до и после воздействия ПМП с различными частотами (5 и 15 мТл). Результаты показали увеличение процента высвобождения лекарственного средства при увеличении напряженности магнитного поля с 5 до 15 мТл (рис. 9). Эта низкая интенсивность поля на частоте 100 кГц вызывает вращение и вибрацию частиц оксида железа, которые создают механические силы, которые вызывают деформацию в фосфолипидной мембране липосомы.

В общем увеличение высвобождения лекарственного средства из липосомы возникает в результате применения ПМП, вызывающего механические силы, которые приводят к большему высвобождению лекарственного средства без разрыва фосфолипидной структуры липосомы. Кроме того, преимущество эффекта нагревания возникает в результате релаксации Нееля колеблющихся магнитолипосом, которые локализуют эффект нагревания в липосоме, не вызывая нагревания окружающей среды. Дополнительным преимуществом использования магнитолипосомы является возможность отслеживать ее внутри человеческого тела до желаемого места высвобождения, что гарантирует максимальную полу-

ченную дозу. Несмотря на то что необходимы дополнительные исследования, чтобы прояснить процесс высвобождения и применения магнитолипосом *in vivo*, гидрофобные МНЧ в мембране обеспечивают эффективный подход для реализации иницилируемого высвобождения груза из липосом в контролируемом объеме и месте.

В дальнейшем запланированы работы по контролю количества лекарственного средства, выпущенного с использованием различных частотных диапазонов магнитного поля при безопасной для биологических систем напряженности.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Hardiansyah, L.-Y. Huang, M.-Ch. Yang, et al., *Nanoscale Res. Lett.* **9**, 497 (2014).
2. P. R. Kulkarni, J. D. Yadav, and K. A. Vaidya, *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **3**, 10 (2011).
3. R. P. Liburdy and T. S. Tenforde, *Rad. Res.* **108**, 102 (1986)
4. Y. Wang and D. S. Kohane, *Nature Rev. Materials* **2**, 17020 (2017). DOI: 10.1038/natrevmats.2017.20
5. A. Akbarzadeh, M. Samiei, and S. Davaran, *Nanoscale Res. Lett.* **7**, 144 (2012).
6. S. Laurent, D. Forge, M. Port, et al., *Chem. Rev.* **110** (4), 2574 (2010). DOI:10.1021/cr900197g
7. Ch. Tapeinos, in *Smart Nanoparticles for Biomedicine* (Elsevier, 2018), pp. 131–142. DOI: 10.1016/B978-0-12-814156-4.00009-4
8. S. L. Pal, U. Jana, P. K. Manna, et al., *J. Appl. Pharmaceut. Sci.* **1** (6), 228 (2011).
9. T. Neuberger, B. Schopf, H. Hofmann, et al., *J. of Magnetism and Magnet. Mater.* **293**, 483 (2005).
10. J. Estelrich, E. Escibano, J. Queralt, and M. A. Busquets, *Int. J. Mol. Sci.* **16** (4), 8070 (2015). DOI: 10.3390/ijms16048070
11. L. A. Tai, P. J. Tsai, Y. C. Wang, et al., *Nanotechnology* **20** (13) (2009). DOI: 10.1088/0957-4484/20/13/135101
12. D. Qiu, and X. An, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **104**, 326 (2013). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.11.033
13. R. I. Blumenthal, *J. Nanomed. Biotherapeutic Discov.* **4** (3), 1000130 (2014). DOI: 10.4172/2155-983x.1000130
14. S. Nappini, M. Bonini, F. Ridi, and P. Baglioni, *Soft Matter* **7** (10), 4801 (2011). DOI: 10.1039/c0sm01264e
15. A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, et al., *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **1** (2), 147 (2012). DOI: 10.1166/jcsb.2012.1020
16. S. Nappini, S. Fogli, B. Castroflorio, et al., *J. Mater. Chem. B* **4**, 716 (2016).
17. Y. I. Golovin, S. L. Gribanovsky, D. Y. Golovin, et al., *J. Control. Release* **219**, 43 (2015).
18. W. Zhan and C. H. Wang, *J. Control. Release* **285**, 212 (2018). doi: 10.1016/j.jconrel.2018.07.006
19. T. Hirsch, F. Jacobsen, H.-U. Steinau, and L. Steinstraesser, *Prot. Peptide Lett.* **15** (3), 238 (2008).
20. L. S. Tavares, M. D. O. Santos, L. F. Viccini, et al., *Peptides* **29** (10), 1842 (2008).
21. S. B. Zaman, M. A. Hussain, R. Nye, et al., *Cureus* **9** (6), e1403 (2017).
22. U. Shimanovich and A. Gedanken, *J. Mater. Chem. B* **4** (5), 824 (2016).
23. A. Gupta, S. Mumtaz, C.-H. Li, et al., *Chem. Soc. Rev.* **48** (2), 415 (2019).
24. D. Belc, C. Chen, R. Roberts, et al., In *Proc. NSTI Nanotechnology Conf. and Trade Show – NSTI Nanotech 2005* (2005), pp. 23–26.
25. R. Spera, F. Apollonio, M. Liberti, et al., *Colloids Surf. B Biointerfaces* **131**, 136 (2015).
26. M. Babincová, P. Čičmanec, V. Altanerová, *Bioelectrochemistry* **55** (1–2), 17 (2002). DOI: 10.1016/S1567-5394(01)00171-2
27. A. Joniec, S. Sek, and P. Krysinski, *Chemistry – Eur. J.* **22** (49), 17715 (2016). DOI: 10.1002/chem.201602809
28. V. M. De Paoli, S. H. Lacerda De Paoli, L. Spinu, et al., *Langmuir* **22**, 5894 (2006).
29. N. C. C. Lobato, Â. de Mello Ferreira, and M. B. Mansur, *Separat. Purif. Technol.* **168**, 93 (2016).
30. E. Touitou, L. Bergelson, B. Godin, and M. Eliaz, *J. Control. Release* **65**, 403 (2000).
31. M. Rady, I. Gomaa, N. Afifi, and M. Abdel-Kader, *Int. J. Pharmaceut.* **548** (1), 480 (2018).
32. G. Podaru, R. Dani, H. Wang, et al., *J. Phys. Chem. B* **118** (40), 11715 (2014). doi: 10.1021/jp5022278
33. C. A. Monnier, D. Burnand, B. Rothen-Rutishauser, et al., *Eur. J. Nanomedicine* **6** (4), 201 (2014). DOI: 10.1515/ejnm-2014-0042
34. A. R. O. Rodrigues, B. G. Almeida, J. M. Rodrigues, et al., *RSC Advances* **7** (25), 15352 (2017). DOI: 10.1039/c7ra00447h
35. K. Y. Vlasova, A. Piroyan, I. M. Le-Deygen, et al., *J. Colloid Interface Sci.* **552**, 689 (2019). DOI: 10.1016/j.jcis.2019.05.071.

Alternating Magnetic Field-Induced Membrane Permeability in Erythromycin Magnetoliposomes: a Potential Solution to Antibiotic Resistance

Bassant M. Salah*, Mai Rady**, Mohammad Abdel-Halim***, Heba M. Fahmy****, Nermeen S. El-Din*, and Mohamed H. Gaber*****, *****

**Physics Department, German University in Cairo, Cairo, Egypt*

***Pharmaceutical Technology Department, German University in Cairo, Cairo, Egypt*

****Pharmaceutical Chemistry Department, German University in Cairo, Cairo, Egypt*

*****Faculty of Science, Cairo University, Giza, Egypt*

******Faculty of Engineering, British University in Egypt, Cairo, Egypt*

Antibiotic resistance is a serious problem facing the world; it is increasing every year due to overuse or misuse of antibiotics which leads to the development of new mechanisms of drug resistance by bacteria. For this study, erythromycin-loaded magnetoliposomes have been prepared and subjected to alternating magnetic field (5 and 15 mT, 100 KHz) for 30 min to test the effect of exposure on the rate of drug export out of the cell behind the resistance mechanism of bacteria. Results showed temperature increases of 4 and 24 degrees Celsius after exposure of erythromycin-loaded magnetoliposomes to 5mT and 15mT, respectively. Moreover, it was found that the percentage of erythromycin exported was greater after exposure to alternating magnetic field ($0.83 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ and $1.33 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ in 5 mT and 15mT AMF, respectively) than that in the control group ($0.24 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$). Exposure to alternating magnetic field induced higher rate of erythromycin release from magnetoliposomes via mechanical actuation of the nanoparticles. These findings suggest that it is possible to trigger and control the drug release by merging the targeted drug delivery system with the nanotechnology and magnetic field. Upon increasing the intensity of the alternating magnetic field, the release rate increased significantly.

Keywords: alternating magnetic field, drug release, drug delivery, erythromycin, magnetoliposomes