

Agnieszka MARKOWSKA-RADOMSKA, Ewa DŁUSKA

e-mail: e.dluska@ichip.pw.edu.pl

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Enkapsulacja materiału i substancji biologicznie aktywnych w emulsjach wielokrotnych

Wstęp

Emulsje wielokrotne to hierarchicznie zorganizowane struktury ciecz-ciecz, w których w fazie ciągłej rozproszone są jedna lub kilka faz wewnętrznych. Układy takie charakteryzują się dużą powierzchnią międzyfazową i funkcjonalną strukturą, która umożliwia m.in. zamykanie (enkapsulację) składników w rozproszonej fazie wewnętrznej i ich uwalnianie z określoną szybkością, kontrolowaną parametrami fizykochemicznymi i rozmiarem kropelek stanowiących przepuszczalną membranę ciekłą oddzielającą krople wewnętrzne od zewnętrznego środowiska. Główne zastosowania emulsji wielokrotnych obejmują obszary medycyny, farmacji, przemysłu chemicznego (procesy transportu selektywnego) i ochrony środowiska (wykorzystanie emulsyjnych membran ciekłych) [Dłuska, 2011].

W problematyce enkapsulacji biologicznie czynnych materiałów, takich jak komórki macierzyste, istotny jest dobór nośników, które zapewniają swobodę migracji komórek, łatwy dostęp do składników odżywczych i czynników wzrostu, oraz odprowadzanie produktów ubocznych. Spełnienie tych warunków sprzyja namnażaniu się komórek i wysokiej ich przeżywalności. Dobry bionośnik komórek macierzystych powinien posiadać [Desai i in., 2012]:

- odpowiedni kształt i wymiary oraz strukturę np. w przypadku nośników typu żeli lub postaci stałej (kapsułki) istotna jest ich duża porowatość zapewniająca przestrzeń dla komórek oraz jednorodność rozkładu porów,
- dużą wytrzymałość mechaniczną i chemiczną,
- biogodność materiału nośników ze środowiskiem (organizmy żywe),
- odpowiednio dobrany mechanizm i czas degradacji materiału biomateriały tzw. kinetykę absorpcyjną materiału.

Poszukiwanie idealnych nośników dla komórek macierzystych jest przedmiotem bardzo dużego zainteresowania z uwagi na:

- zastosowania komórek macierzystych w inżynierii tkankowej do różnego typu terapii regeneracyjnych *in vivo* (wszczepienie implantu) lub *in vitro* (rekonstrukcja tkanki w bioreaktorze), a także np. w terapiach antyrakowych, walce z chorobą *Alzheimera*, *Parkinsona*, udarami i chorobami wątroby czy serca.
- bankowanie i transport komórek.

Podobne wymogi dotyczą nośników substancji czynnych typu leków.

W ostatnim czasie dużą uwagę zwraca się na nośniki komórek macierzystych typu *core-shell* z ciekłymi rdzeniami, które zwiększają przeżywalność komórek w porównaniu do tradycyjnych stałych matryc 3D [Zhang i He, 2009; Nishiura i in., 2013].

W pracy przedstawiono wyniki badań wykorzystania emulsji wielokrotnych jako emulsyjnych nośników leków i komórek macierzystych. Wyniki te wpisują się w aktualny nurt badawczy nośników substancji aktywnych z ciekłymi rdzeniami.

Badania enkapsulacji materiału biologicznego

Układ badawczy i metodyka

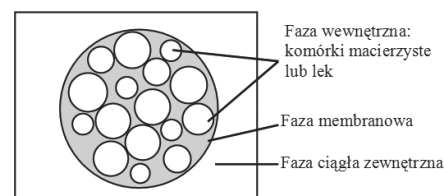
Celem badań było wytworzenie stabilnych emulsji wielokrotnych oraz określenie żywotności mysich komórek embrionalnych mESCs (*mouse Embryonic Stem Cells*) wykorzystywanych jako modelowy materiał biologiczny enkapsulowany w emulsjach wielokrotnych.

Zakres badań obejmował dobór składu i warunków wytwarzania stabilnych, aktywnych biologicznie emulsji, określenie ich podstawowej charakterystyki (średni rozmiar i rozkład rozmiarów kropelek) oraz stopnia żywotności komórek.

W toku badań ustalono, że nośnikiem komórek będą emulsje typu $W_1/O/W_2$, które otrzymywano metodą dwustopniową w aparatach o działaniu okresowym typu zbiornik z mieszadłem w warunkach jałowych w komorze laminarnej. Metoda obejmowała etap wytwarzania emulsji prostych typu W_1/O (zbiornik pierwszy), a następnie ich redystrybucji w odpowiedniej fazie ciągłej w zbiorniku drugim w celu wytworzenia emulsji podwójnej $W_1/O/W_2$.

Wytwarzanie emulsji aktywnych biologicznie. Schemat bionośnika emulsyjnego przedstawiono na rys. 1. Fazę wewnętrzną (W_1) emulsji stanowił wodny roztwór alginianu sodu z zawiesiną embrionalnych komórek mysich, fazę membranową (O) olej mineralny z dodatkiem surfaktantu *Span 80*, natomiast fazą ciągłą emulsji (W_2) była woda z dodatkiem *Tweenu 20*.

Wytwarzanie emulsji aktywnych biologicznie prowadzono w zbiornikach dla zakresu częstotliwości obrotowych mieszadła: 100÷350 obr./min, objętość cieczy w każdym zbiorniku wynosiła 660 cm³.



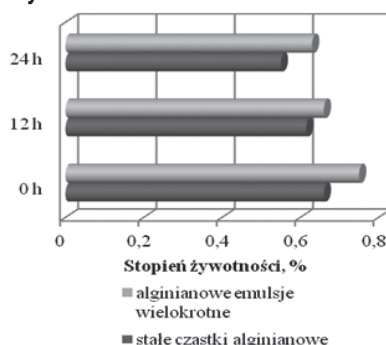
Rys. 1. Schemat bionośnika emulsyjnego

Po zbadaniu wpływu stężenia zawiesiny komórek macierzystych na średni rozmiar kropelek fazy membranowej emulsji wielokrotnej oraz stabilność emulsji (analiza obrazu mikroskopowego w czasie) do badań żywotności komórek wybrano emulsje o średnim rozmiarze kropelek fazy membranowej 300 μm odpowiadającym stężeniu komórek: 1 milion/cm³ alginianu.

Wielkość kropelek wyznaczano na podstawie analizy obrazu mikroskopowego i po uwzględnieniu udziału kropelek danego rozmiaru obliczono średnicę *Sautera* D_{32} kropelek fazy membranowej (rozkład kropelek przedstawiono w formie zależności jak na rys. 3 dla innej substancji czynnej).

Stopień żywotności komórek w kroplach badano natychmiast po procesie enkapsulacji, po 12 godzinach oraz po 24 godzinach (warunki stabilnych emulsji). Stopień żywotności określano jako stosunek różnicy liczby komórek żywych enkapsulowanych w kropli i liczby komórek żywych po danym czasie do liczby pierwotnie enkapsulowanych żywych komórek.

Wyniki i ich analiza



Rys. 2. Stopień żywotności komórek macierzystych (mESCs) w zależności od formy bionośnika

Wyniki badań stopnia żywotności komórek przedstawiono na rys. 2 w porównaniu do stopnia żywotności komórek zamykanych w tradycyjnych matrycach stałych.

Wyniki badań wykazały wyższy stopień żywotności komórek macierzystych mESCs w bionośniku emulsyjnym w porównaniu do stałych cząstek alginianowych – matryce typu 3D. W obu przypadkach obserwowano podobne tempo spadku stopnia żywotności komórek

w czasie pomiarowym. Różnice stopnia żywotności komórek między nośnikami tradycyjnym i emulsyjnym zmieniły się średnio o 9÷11%.

Badania enkapsulacji substancji aktywnych biologicznie (leku)

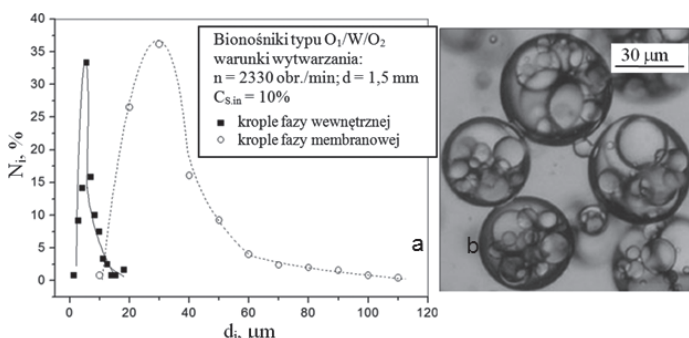
Układ badawczy i metodyka

Celem badań było wytworzenie stabilnych aktywnych emulsji wielokrotnych oraz określenie stopnia enkapsulacji leku w emulsji. Zakres badań obejmował dobór składu emulsji oraz określenie warunków procesowych wytwarzania stabilnych emulsji wielokrotnych do enkapsulacji hydrofobowego leku.

Aparatura. Emulsje wytwarzano w biokontaktorze z przepływem Couetta-Taylora (CTF) wg procedury opisanej w pracy [Markowska-Radomska i Dłuska, 2012]. Kontaktor CTF umożliwia realizację procesu emulsyfikacji w jednym aparacie w wyniku kontaktu trzech strumieni ciekłych w szczeliny pierścieniowej, w której ma miejsce przepływ osiowy i rotacyjny z wirami Taylora lub bez, w zależności od częstości obrotowej cylindra wewnętrznego [Markowska-Radomska i Dłuska, 2012].

Substancją biologicznie aktywną wybraną do badań modelową był salicylan fenylu (salol), stosowany w leczeniu infekcji przewodu pokarmowego i dróg moczowych, jako łagodny środek przeciwbólowy, a także zewnętrznie do dezynfekcji ran, nadżerek jamy ustnej i narządów płciowych.

Zakres badań. Badano wpływ warunków hydrodynamicznych w biokontaktorze CTF tj. wielkości i stosunku strumieni faz: organicznej i wodnej, szerokości szczeliny biokontaktora (d) oraz intensywności ruchu rotacyjnego (n) na właściwości emulsji tzn. ich stabilność, rozkłady rozmiarów kropeł fazy wewnętrznej i środkowej (Rys. 3), upakowanie kropeł fazy membranowej kroplami fazy wewnętrznej (ϕ) oraz lepkość emulsji wielokrotnych, a także wpływ stężenia składnika biologicznie aktywnego w strumieniu wprowadzanym do biokontaktora ($C_{s, in}$).



Rys. 3. Charakterystyka emulsji otrzymywanych w biokontaktorze: a) rozkład rozmiarów kropeł faz wewnętrznej i membranowej (N_i – zawartość liczbowa kropeł i -tej frakcji w populacji; d_i – średnica kropeł); b) przykładowe zdjęcie emulsji

Schemat emulsyjnego nośnika leku przedstawiono na rys. 1. Fazę wewnętrzną (O_1) emulsji stanowił roztwór salolu (10; 20% wag.) w parafinie ciekłej, fazę membranową (W) roztwór wodny żelatyny (15% wag.) i sacharozy (5% wag.), a fazę ciągłą emulsji (O_2) parafina ciekła.

Wytwarzanie emulsji wielokrotnych obejmowało dyspersgowanie faz z jednoczesną stabilizacją fazy membranowej emulsji. Stabilizacja ta polegała na sieciowaniu żelatyny za pomocą cukrów prostych – produktów hydrolizy sacharozy w roztworze wodnym (pH roztworu żelatyny 4,5), [Dłuska i Markowska, 2009]. Dodatek sacharozy jako czynnika stabilizującego związany był z koniecznością zapewnienia wymaganych warunków dla badań uwalniania (temperatura odpowiadająca ciepłocie ciała), w których żelatyna posiada dobrą rozpuszczalność prowadzącą do zbyt szybkiego uwolnienia składnika.

Wyniki i ich analiza

Do badań enkapsulacji składnika czynnego wybrano 4 grupy emulsji wytwarzanych w różnych warunkach hydrodynamicznych biokontaktora CTF (warunki podano w tab. 1). Każda z 4 analizowanych grup emulsji, oznaczona jako E1-E4, charakteryzowała się innymi rozmiarami kropeł faz membranowej i wewnętrznej (wyrażone jako średnice Sautera: D_{32} , d_{32}), stopniem upakowania kropeł fazy membranowej kroplami fazy wewnętrznej (ϕ), a zatem i inną możliwością enkapsulacji

składnika aktywnego, którą badano i oceniano na podstawie porównania sprawności enkapsulacji (EE) substancji czynnej. Charakterystykę bionośników typu $O_1/W/O_2$ z lekiem hydrofobowym otrzymywanych w różnych warunkach hydrodynamicznych biokontaktora CTF podano w tab. 1.

Sprawność enkapsulacji (EE) składnika biologicznie aktywnego (leku) była obliczana na podstawie bilansu masy leku wprowadzanego i obecnego w fazie ciągłej emulsji wielokrotnej po procesie emulsyfikacji. Sprawność (EE) definiowano jako stosunek różnicy masy składnika wprowadzanego do układu o określonej objętości w procesie emulsyfikacji i masy składnika obecnego w fazie ciągłej wytworzonej emulsji, do masy składnika wprowadzonego [Dłuska, 2011]. Dokładny opis procedury wyznaczania sprawności zamykania związku biologicznie aktywnego, którym był salicylan fenylu podano w pracach [Dłuska i Markowska, 2009; Dłuska, 2011].

Średnice Sautera określono na podstawie analizy obrazu mikroskopowego kropeł i udziału kropeł danego rozmiaru. Przykład rozkładu rozmiarów populacji kropeł pokazano na rys. 3.

Tab. 1. Charakterystyka bionośników typu $O_1/W/O_2$ z lekiem hydrofobowym

Bionośniki $O_1/W/O_2$	n (obr./min)	ϕ (-)	$C_{s, in}$ (%)	D_{32} (μm)	d_{32} (μm)	EE (%)
E1	1830	0,83	10	66,58	32,76	94,7
E2	1830	0,74	20	65,26	35,31	69,8
E3	2330	0,64	10	54,78	9,55	64,6
E4	2330	0,76	20	50,50	20,24	74,2

Szczelina biokontaktora $d = 1,5$ mm.

Najkorzystniejszy stosunek strumieni faz: (wew./zew.) = 0,5; (memb./zew.) = 0,1

Wnioski

Wyniki badań enkapsulacji materiału biologicznego (komórki mESC) oraz związków biologicznie czynnych (leku) wykazały wyższy stopień żywotności komórek zamykanych w ciekłych rdzeniach (krople wewnętrznej emulsji wielokrotnej) w porównaniu do tradycyjnych stałych nośników matrycowych - 3D.

Zwiększenie przeżywalności komórek macierzystych umieszczonych w bionośniku emulsyjnym wynika z elastyczności ciekłych rdzeni oraz z większej efektywności transportu składników odżywczych i możliwości usuwania metabolitów do zewnętrznego medium przez ciekłą fazę membranową emulsji, w porównaniu do stałej membrany nośników tradycyjnych.

Wyniki badań enkapsulacji związków biologicznie czynnych potwierdziły możliwość wykorzystania wewnętrznej struktury emulsji wielokrotnych jako mikrośrodowiska substancji aktywnych. Uzyskano wysokie stopnie enkapsulacji (65-95%), w zależności od charakterystyki struktury kropeł emulsji wielokrotnej i stężenia substancji aktywnej zależnej od warunków ich wytwarzania.

LITERATURA

- Desai E.S., Tang M.Y., Ross E.A., Gemeinhart R.A., 2012. Critical factors affecting cell encapsulation in superporous hydrogels. *Biomed. Mat.*, 7, 2, 024108. DOI: 10.1088/1748-6041/7/2/024108
- Dłuska E., 2011. Wymiana masy w układach emulsji wielokrotnych. *Prace WChP*, 25, nr 2, 3-116 (ISSN: 1234-4354)
- Dłuska E., Markowska A., 2009. One-step preparation method of multiple emulsions entrapping reactive agent in the liquid-liquid Couette-Taylor flow. *Chem. Eng. Proc.: Proc. Intens.*, 48, 438-445. DOI: 10.1016/j.ccep.2008.06.005
- Markowska-Radomska A., Dłuska E., 2012. The multiple emulsion entrapping active agent produced via one-step preparation method in the liquid-liquid helical flow for drug release study and modeling, colloid and polymer science. *Prog. Coll. Polym. Sci.*, 139, 29-34. DOI: 10.1007/978-3-642-28974-3_6
- Nishiura H., Sugimoto M. K., Akiyama K., 2013. A novel nano-capsule of α -lipoic acid as a template of core-shell structure constructed by self-assembly. *J. Nanomed. Nanotech.*, 4, 1, 1000155. DOI: 10.4172/2157-7439.1000155
- Zhang W., He X., 2009. Encapsulation of living cells in small (~100 μm) alginate microcapsules by electrostatic spraying: A parametric study. *J. Biomech. Eng.*, 131, 7, 074515. DOI: 10.1115/1.3153326