

Инкапсулирование рибофлавина в альгинатные микрочастицы*

П.В. Крикунова, Т.В. Букреева, Т.Н. Паллаева

Включение рибофлавина в полимерные частицы является перспективным направлением в области разработки форм его доставки пролонгированного действия. Полиморфные формы рибофлавина – тип В/С и тип Р – инкапсулированы в частицы альгината натрия. При включении в альгинатную матрицу рибофлавин образует сферические сростки кристаллов, обладающих флуоресцентными свойствами. Исследование высвобождения вещества показало пролонгированный характер релиза для частиц, загруженных рибофлавином типа Р.

Ключевые слова: альгинатные частицы, рибофлавин, пролонгированное высвобождение.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №20-04-60357).

Введение

На сегодняшний день роль рибофлавина (витамина В₂) для поддержания жизнедеятельности живых организмов неоспорима. В составе флавин-коферментов – флавиномононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД) – он играет важнейшую роль в основном метаболическом пути клетки, является промежуточным переносчиком электронов и протонов в дыхательной цепи, а также участником реакций окисления жирных кислот [1].

Рибофлавин также выступает отличным природным фотосенсибилизатором, который под воздействием света производит активные формы кислорода, вызывая окислительное повреждение клеток и тканей [2]. Ранее было показано успешное применение витамина В₂ против золотистого стафилококка (MRSA), а рибофлавин продемонстрировал высокую эффективность против MRSA и синергизм с различными антибиотиками [3]. Оценено большое влияние рибофлавина, активированного ультрафиолетовым светом, на различные (DENV 1–4) серотипы вирусов денге [4]. Эффективность витамина В₂ при облучении ультрафиолетовым и синим светом была продемонстрирована для противоопухолевой [5] и антибактериальной [3] терапии.

Клиническое применение рибофлавина в качестве природного фотосенсибилизатора ограничено из-за его плохой растворимости в воде и, как следствие, низкой биодоступности и фармакокинетики. Ранее нами была продемонстрирована фотосенсибилизирующая активность водорастворимых ФМН и их производного, синтезированного путем конъюгации с полиэтиленгликолем по отношению как к грамположительным, так и к грамотрицательным микроорганизмам при аФДТ в условиях

in vitro [6]. В работе [7] был описан подход к перекристаллизации коммерческого рибофлавина типа А в слегка гидрофобный В/С-тип и новую гидрофильную кристаллическую форму, названную Р-типом. Метод модификации кристаллов рибофлавина, основанный на перекристаллизации из разбавленного щелочного раствора, обеспечивает беспрецедентно высокую растворимость в воде, достигающую 23.5 г/л. Следует отметить, что фармакологическая активность рибофлавина в ряде случаев превосходит активность его производных [8].

Значительное повышение растворимости рибофлавина открывает дополнительные перспективы для исследований его включения в полимерные носители с целью разработки средств доставки, обеспечивающих пролонгированное высвобождение активного компонента. Инкапсулированная форма рибофлавина может найти применение не только в биомедицинских направлениях, но и при разработке защитных антибактериальных покрытий, например на пищевых производствах. Это побудило нас исследовать инкапсулирование рибофлавина В/С-типа и Р-типа в



КРИКУНОВА
Полина Вадимовна
ФНИЦ «Кристаллография и
фотоника» РАН



БУКРЕЕВА
Татьяна Владимировна
ФНИЦ «Кристаллография и
фотоника» РАН



ПАЛЛАЕВА
Татьяна Николаевна
ФНИЦ «Кристаллография и
фотоника» РАН

микрочастицы на основе альгината натрия, полученные методом «внутреннего желирования». В работе показана эффективность инкапсулирования обоих типов рибофлавина в полимерные частицы, обеспечивающие пролонгированное высвобождение препарата

Материалы и методы

Материалы

Рибофлавин (РФ), гидроксид натрия (NaOH), азотная кислота (HNO_3), альгинат натрия (NaAlg), хлорид кальция (CaCl_2) категории «х.ч.» производства Sigma-Aldrich (США). Диметилсульфоксид (ДМСО) 99% производства Тульской фармацевтической фабрики (Россия). Все растворы приготовлены с использованием сверхчистой воды (тип 1) произведенной с использованием системы SimplicityUV (Merck Millipore, Германия). Все химические вещества использовались без дополнительной очистки.

Методы

Получение альгинатных частиц с рибофлавином типа В/С. 10 мг рибофлавина растворяли в 1 мл 0.1 М NaOH. Полученный раствор смешивали в соотношении 1:1 с 2% раствором альгината натрия и вводили с помощью дозатора в объеме 2 или 10 мкл в 0.5% раствор CaCl_2 . После формирования частицы промывали водой и сушили лиофильно.

Получение альгинатных частиц с рибофлавином типа Р. 5 мг рибофлавина Р-типа растворяли в 1 мл 2% раствора альгината натрия. Затем 2 или 10 мкл полученного раствора добавляли в 0.5% раствор CaCl_2 . Сформированные частицы промывали водой и сушили лиофильно.

Леофильная сушка. Перед леофильной сушкой образцы замораживали в холодильнике при температуре -22°C . Процесс леофилизации проводили на приборе Labconco Free Zone 1 при температуре -50°C и давлении около 2 Па.

Оптическая микроскопия. Первичную характеристику морфологии и цвета полученных образцов проводили на оптическом микроскопе Nikon Eclipse E200 (Япония) с использованием объектива E Plan 10x/0.25.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ).

Оптические изображения микроструктур получали с помощью системы конфокального сканирования Leica TCS SP (Leica, Германия).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). СЭМ-изображения образцов получали с помощью сканирующего электронного микроскопа JCM-6000 Plus NeoScope (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 10/15кВ в режиме вторичных электронов.

Исследование высвобождения рибофлавина. Альгинатную частицу объемом 10 мкл (0.05 мг) добавляли к 1 мл дистиллированной воды (pH 5). Исследование проводилось с использованием планшетного шейкера Miulab ST70-2 (Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd., Китай), раствор из лунки отбирали через определенные промежутки времени и анализировали на спектрофотометре Perkin Elmer Lambda 650 в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм. Концентрации этих образцов определяли с помощью калибровочных прямых. Все измерения проводились при комнатной температуре.

Результаты

Для получения альгинатных частиц, загруженных рибофлавином (РФ), были исследованы две его кристаллические модификации, а именно тип В/С и тип Р. В первом случае использование коммерческого РФ в щелочном растворе приводит к кристаллизации слаборастворимого в воде рибофлавина типа В/С. Во втором случае мы загружали полученный ранее гидрофильный рибофлавин типа Р в раствор альгината, что не требовало использования щелочного раствора.

Полученные частицы имеют слегка неправильную сферическую форму (рис. 1) вследствие того, что альгинатный раствор вводился вручную с помощью дозатора. По мере того как альгинат теряет воду, образуются сферические сростки кристаллов рибофлавина. Расчетное количество рибофлавина на одну частицу составляет 0.05 мг, при этом в процессе полимеризации некоторая часть рибофлавина высвобождалась в объем раствора CaCl_2 и при промывке в воде.

Исследования методом СЭМ продемонстрировали, что частицы обладают шероховатой поверхностью, их размер изменяется в пределах от 500 до 900 мкм. Полученные частицы характеризуются как почти сферической, так и неправильной формами, что связано с усадкой геля при сушке в условиях вакуума (рис. 2). Хотя на изображениях, полученных на оптическом микроскопе, отчетливо видны кристаллы рибофлавина, на сканирующем электронном микроскопе мы не можем их

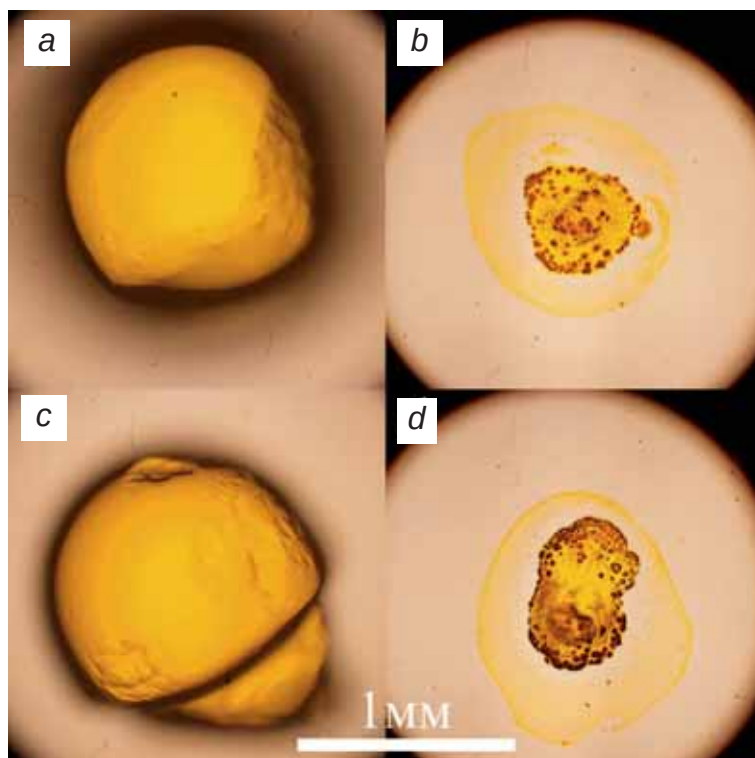


Рис. 1. Изображения альгинатных частиц с рибофлавином, полученные на оптическом микроскопе: а-б – альгинатная частица, загруженная коммерческим рибофлавином (сразу после синтеза и спустя 5 дней соответственно); с-д – альгинатная частица с рибофлавином типа Р (сразу после синтеза и спустя 5 дней соответственно).

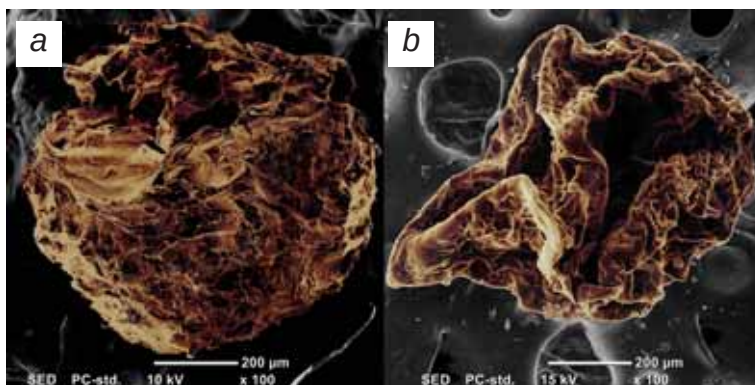


Рис. 2. СЭМ-изображения альгинатной частицы, загруженной рибофлавином В/С- (а) и Р-типа (б).

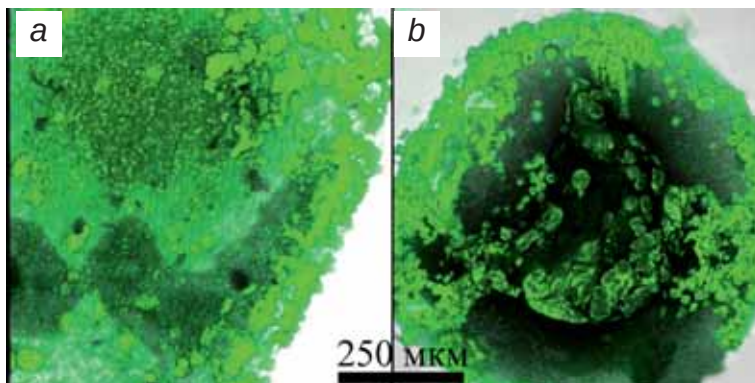


Рис. 3. Изображения альгинатных частиц с рибофлавином типа В/С (а) и типа Р (б), полученные при обработке стека изображений конфокальной флуоресцентной микроскопии (сканирование по оси z).

увидеть, поскольку сrostки находятся внутри альгинатного геля.

Результаты конфокальных исследований подтверждают оптические наблюдения. Частицы, загруженные рибофлавином двух типов, демонстрируют флуоресценцию при возбуждении диодным лазером с длиной волны 450 нм (рис. 3). Нами было проведено сканирование по оси z, и с использованием программного обеспечения LAS-X было получено изображение частиц в объеме. Рибофлавин кристаллизуется в виде сферических сrostаний (рис. 3б) и распределяется у поверхности геля (рис. 3а), также некоторое количество вещества существует в аморфной форме.

Далее было исследовано высвобождение рибофлавина из частиц в воде при комнатной температуре. Как видно из графика (рис. 4), в случае с частицами, загруженными типом В/С, рибофлавин высвобождается практически только в первые минуты инкубации. При этом количество вышедшего в раствор вещества составило 0.012 мг/мл – это примерно 25% от исходной концентрации рибофлавина в растворе альгината.

Частицы, загруженные типом Р, демонстрируют пролонгированный характер высвобождения вещества, при этом выход рибофлавина приближается к 40% от исходной концентрации в растворе альгината и составляет примерно 0.018 мг/мл.

Заключение

Рибофлавин двух полиморфных модификаций успешно инкапсулирован в альгинатные частицы. При испарении растворителя в объеме геля формируются сферические сrostки кристаллов рибофлавина, что подтверждается данными оптической и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Лиофильная сушка затрудняет образование кристаллических форм рибофлавина внутри полимерной матрицы. Таким образом, показана возможность влиять на

фазовый состав рибофлавина за счет различных методов сушки. Частицы, загруженные рибофлавином типа Р, демонстрируют пролонгированное высвобождение вещества, в то время как тип В/С высвобождается в первые минуты инкубации. Помимо этого, по предварительной оценке, концентрация рибофлавина типа Р в альгинатных частицах больше по сравнению с типом В/С. Разработанная система пролонгированного действия в виде инкапсулированной в альгинатные частицы гидрофильной производной рибофлавина может стать перспективной основой создания новых лекарственных форм и антибактериальных покрытий.

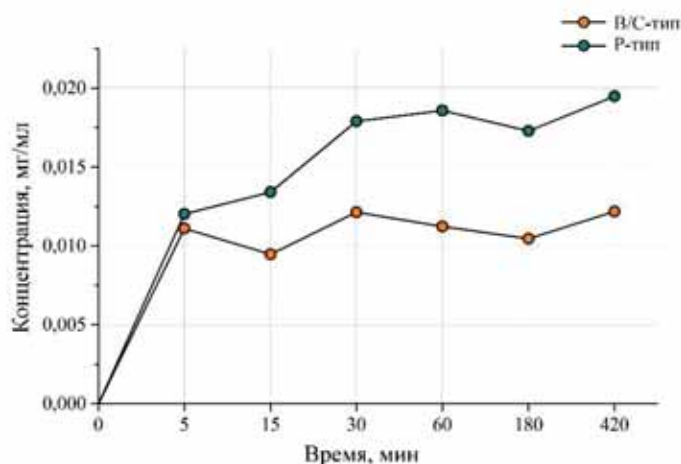


Рис. 4. Исследование высвобождения рибофлавина типа В/С и Р в воде при комнатной температуре.

Литература

1. V. Massey
Biochem. Soc. Trans., 2000, **28**, 283. DOI: 10.1042/bst0280283.
2. N. Farah, V.K. Chin, P.P. Chong, W. F. Lim, C.W. Lim, R. Basir, S.K. Chang, T. Y. Lee
Curr. Res. Microb. Sci., 2022, **3**, 100111.
DOI: 10.1016/j.crmicr.2022.100111.
3. K. Makdoui, R. Goodrich, A. Bäckman
Acta Ophthalmol., 2017, **95**, 498. DOI: 10.1111/aos.13409.
4. H.M. Faddy, J.J. Fryk, D. Watterson, P.R. Young, N. Modhiran, D.A. Muller, S.D. Keil, R.P. Goodrich, D.C. Marks
VoxSang., 2016, **111**, 235.
DOI: 10.1111/vox.12414.
5. R.A. Akasov, N.V. Sholina, D.A. Khochentkov, A.V. Alova, P.V. Gorelkin, A.S. Erofeev, A.N. Generalova, E.V. Khaydukov
Sci. Rep., 2019, **9**, 9679.
DOI: 10.1038/s41598-019-46115-w.
6. Т.Н. Бородин, Э.Р. Толордава, М.Е. Николаева, А.И. Соловьев, Ю.М. Романова, Е.В. Хайдуков, В.Я. Панченко
Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2021, **4**, 21.
DOI: 10.17116/molgen20213904121.
7. P.V. Krikunova, E.R. Tolordava, N.A. Arkharova, D.N. Karimov, T.V. Bukreeva, V.Z. Shirinian, E.V. Khaydukov, T.N. Pallaeva
ACS Appl. Mater. Inter., 2024, **16** (5), 5504.
DOI: 10.1021/acsami.3c15853.
8. C. Jin, Y. Yao, A. Yonezawa, S. Imai, H. Yoshimatsu, Y. Otani, T. Omura, S. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Matsubara
Biol. Pharm. Bull., 2017, **40**, 1990.
DOI: 10.1248/bpb.b17-00292.
9. T. Shuxian, Z. Ying, W. Haitao, W. Yuqiao, Z. Hexiang, C. Yu, C. Shusen, J. Shaohua, Y. Ziming, L. Puwang, L. Sidong
Mar. Drugs., 2018, **16**, 476.
DOI: 10.3390/md16120476.

English

Encapsulation of Riboflavin into Alginate Microparticles*

Polina V. Krikunova

FSRC «Crystallography and photonics», RAS
59, bld 1, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia
krikunova.pv@gmail.com

Tatiana N. Pallaeva

FSRC «Crystallography and photonics», RAS
59, bld 1, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia
borodina@crys.ras.ru

Tatiana V. Bukreeva

FSRC «Crystallography and photonics», RAS
59, bld 1, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia
bukreeva@crys.ras.ru

Abstract

The encapsulation of riboflavin in polymer particles is a promising direction in the development of long-acting forms of riboflavin delivery. Polymorphic forms of riboflavin – type B/C and type P – are encapsulated in sodium alginate particles. When incorporated into an alginate matrix, riboflavin forms spherical agglomerates of crystals

with fluorescent properties. A release study showed a prolonged release pattern for particles loaded with type P riboflavin.

Keywords: alginate particles, riboflavin, sustained release.

*The work was financially supported by RFBR (project 20-04-60357).

Images

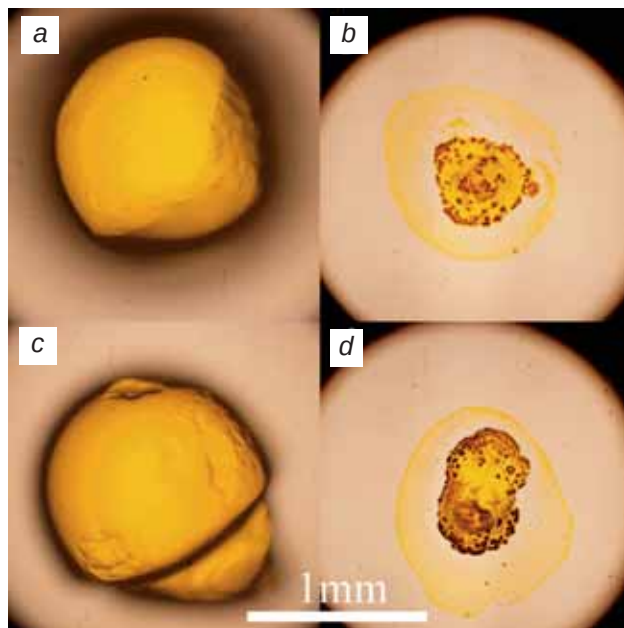


Fig. 1. Optical microscope images of alginate particles loaded with riboflavin: a-b – alginate particle loaded with commercial riboflavin (immediately after synthesis and 5 days after, respectively); c-d – alginate particle loaded with P type riboflavin (immediately after synthesis and 5 days after, respectively).

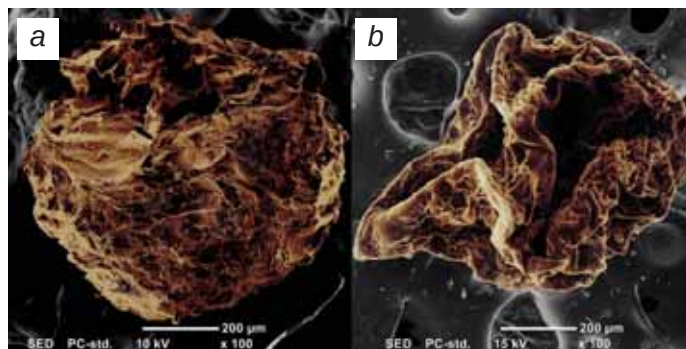


Fig. 2. SEM images of alginate particle loaded with B/C (a) and P type riboflavin (b).

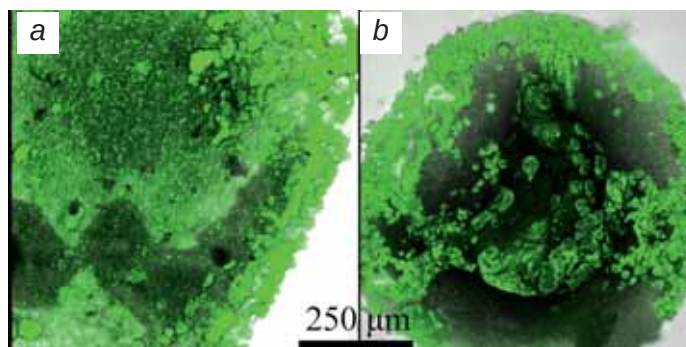


Fig. 3. Images of alginate particles loaded with B/C type riboflavin (a) and P type riboflavin (b) obtained from confocal fluorescence microscopy image stack processing (z-axis scan).

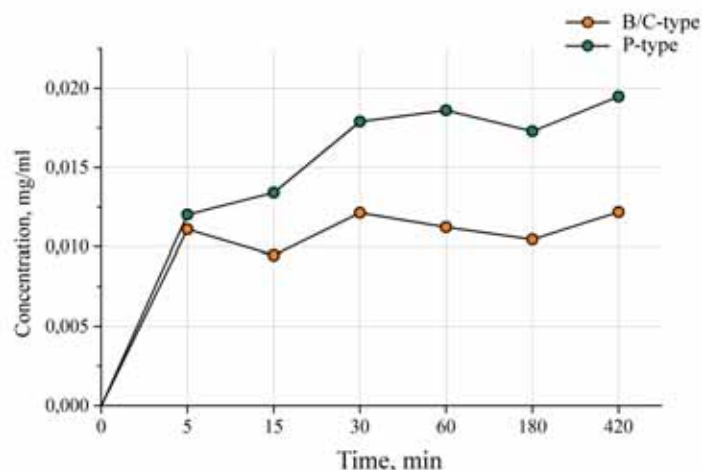


Fig. 4. Release study of B/C- and P-type riboflavin in water at room temperature.

References

1. V. Massey
Biochem. Soc. Trans., 2000, **28**, 283. DOI: 10.1042/bst0280283.
2. N. Farah, V.K. Chin, P.P. Chong, W. F. Lim, C.W. Lim, R. Basir, S.K. Chang, T. Y. Lee
Curr. Res. Microb. Sci., 2022, **3**, 100111. DOI: 10.1016/j.crmicr.2022.100111.
3. K. Makdoui, R. Goodrich, A. Bäckman
Acta Ophthalmol., 2017, **95**, 498. DOI: 10.1111/aos.13409.
4. H.M. Faddy, J.J. Fryk, D. Watterson, P.R. Young, N. Modhiran, D.A. Muller, S.D. Keil, R.P. Goodrich, D.C. Marks
VoxSang., 2016, **111**, 235. DOI: 10.1111/vox.12414.
5. R.A. Akasov, N.V. Sholina, D.A. Khochonkov, A.V. Alova, P.V. Gorelkin, A.S. Erofeev, A.N. Generalova, E.V. Khaydukov
Sci. Rep., 2019, **9**, 9679. DOI: 10.1038/s41598-019-46115-w.
6. T.N. Borodina, E.R. Tolordava, M.E. Nikolaeva, A.I. Solov'ev, Yu.M. Romanova, E.V. Khaydukov, V.Ya. Panchenko
Molecular Genetics Microbiology and Virology (Russian version), 2021, **39**(4), 21 (in Russian). DOI: 10.17116/molgen20213904121.
7. P.V. Krikunova, E.R. Tolordava, N.A. Arkharova, D.N. Karimov, T.V. Bukreeva, V.Z. Shirinian, E.V. Khaydukov, T.N. Pallaeva
ACS Appl. Mater. Inter., 2024, **16** (5), 5504. DOI: 10.1021/acsami.3c15853.
8. C. Jin, Y. Yao, A. Yonezawa, S. Imai, H. Yoshimatsu, Y. Otani, T. Omura, S. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Matsubara
Biol. Pharm. Bull., 2017, **40**, 1990. DOI: 10.1248/bpb.b17-00292.
9. T. Shuxian, Z. Ying, W. Haitao, W. Yuqiao, Z. Hexiang, C. Yu, C. Shusen, J. Shaohua, Y. Ziming, L. Puwang, L. Sidong
Mar. Drugs., 2018, **16**, 476. DOI: 10.3390/md16120476.