

УДК 621.3.015.333, 57.085.23, 577.352
EDN: QESSYH

PACS: 84.70.+p, 87.16.Dg



Использование электрофизической установки для импульсного воздействия на биологические мембраны и оценка их жизнеспособности

В. В. Воеводин, Е. А. Воротеляк, А. И. Крюков, Н. Л. Кунельская, В. В. Мищенко,
С. В. Небогаткин, О. С. Роговая, К. И. Романов, А. А. Рябинин, В. Ю. Хомич,
Е. А. Шершунова

Описана импульсная электрофизическая установка для транспортировки лекарств через биологические мембраны без естественных каналов. Описаны модельные мембраны круглого окна внутреннего уха человека и первые результаты по влиянию параметров установки на подобные мембраны. Экспериментально исследована жизнеспособность клеток биологических мембран в разных режимах тока. Определены пороговые значения постоянного и импульсного тока при сохранении значительной жизнеспособности клеток мембран.

Ключевые слова: доставка лекарственных препаратов, биологические мембраны, круглое окно внутреннего уха, электропорация, ионофорез, электродная ячейка, электрофизическая установка, жизнеспособность клеток.

DOI: 10.51368/1996-0948-2024-2-96-102

Введение

Ограничения в скорости кровотока и преодоление гематолабиринтного барьера при использовании энтеральных и парентеральных методов доставки лекарств приводят к необходимости применения высоких концентраций. Этот подход может вызывать нецелевую доставку препаратов и негативные побочные

эффекты [1]. Местное направленное введение лекарств в последнее время [2] получило широкое применение.

Среди методов доставки препаратов во внутренне ухо можно выделить интратимпанальный и интракохлеарный.

Интратимпанальная доставка – это метод с низкой инвазивностью, при котором препарат инъецируется или перфорируется

Воеводин Вадим Вадимович¹, с.н.с., к.т.н.
Воротеляк Екатерина Андреевна², зав. лаб., д.м.н., член-корр. РАН.

Крюков Андрей Иванович³, директор, д.м.н., член-корр. РАН.

Кунельская Наталья Леонидовна³, зам. директора по научной работе, д.м.н.

Мищенко Валерий Владимирович², с.н.с., к.т.н.

Небогаткин Сергей Вячеславович¹, зав. лаб., к.т.н.

Роговая Ольга Сергеевна³, с.н.с., к.б.н.

Романов Кирилл Ильич¹, инженер.

Рябинин Андрей Александрович³, инженер-исследователь.

Хомич Владислав Юрьевич¹, д.ф.-м.н., академик РАН.
Шершунова Екатерина Александровна¹, зав. лаб., к.т.н.

E-mail: eshershunova@ieeras.ru

¹ Институт электрофизики и электроэнергетики РАН. Россия, 191186, Санкт-Петербург, Дворцовая наб., 18.

² Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова Российской академии наук.

Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26.

³ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л. И. Свержевского. Россия, 117152, Москва, Загородное шоссе, 18А, стр. 2.

Статья поступила в редакцию 30.01.2024

После доработки 26.02.2024

Принята к публикации 6.03.2024

Шифр научной специальности: 1.3.13

© Воеводин В. В., Воротеляк Е. А., Крюков А. И., Кунельская Н. Л., Мищенко В. В., Небогаткин С. В., Роговая О. С., Романов К. И., Рябинин А. А., Хомич В. Ю., Шершунова Е. А., 2024

через барабанную перепонку в среднее ухо. Применяется для лечения таких заболеваний, как болезнь Меньера [3, 4] и синдрома потери слуха [5]. К недостаткам метода можно отнести необходимость преодоления биологического барьера мембраны круглого окна, что требует времени и достаточной концентрации лекарства, в результате метод показывает низкую степень прохождения лекарственного препарата [6].

Интракохлеарный метод доставки обеспечивает высокую эффективность, минуя среднее ухо, и является наиболее эффективным в плане целевой доставки лекарства [2], поскольку концентрация при введении непосредственно во внутреннее ухо близка к 100 % [6]. Однако несмотря на эффективность метода появляется риск осложнений, поскольку хирургические вмешательства во внутреннее ухо могут привести к полной потере слуха [7–9].

Для усиления транспорта лекарств через барьеры используют различные методики, среди которых наиболее известен ионофорез – метод доставки лекарственных веществ через кожу или другие биологические мембраны с помощью электрического тока. Этот процесс основан на применении электрического поля для перемещения ионов лекарственных веществ через ткани. Основными механизмами переноса являются дрейф заряженных частиц в электрическом поле и электроосмос, а также пассивная проницаемость вещества [10–12].

Для увеличения проницаемости клеточных мембран может также быть использовано явление электропорации – формирования водных пор в мембране под воздействием переменного электрического поля. Как правило, для электропорации используется импульсное униполярное напряжение с микросекундной длительностью фронта и микро-миллисекундной длительностью импульса, создающее поле с напряженностью в несколько сотен вольт на сантиметр [13–16]. Возможность гибкого регулирования длительности импульса (от нано до миллисекунд) и амплитуды напряжения способствует подбору наиболее оптимального режима электропорации с наименьшими побочными эффектами [17].

Основываясь на вышесказанном, можно предположить, что применение сочетанного ионофоретического-электропоративного метода, т. е. применение совместно эффекта ионофореза и электропорации, может способствовать доставке больших заряженных молекул через биологические мембраны, а, следовательно, быть использовано для доставки синтетических глюкокортикоидов, например, дексаметазона, через мембрану круглого окна внутреннего уха человека. Однако этот метод не может быть опробован без изучения влияния электрофизических параметров на клетки мембран. В связи с чем, целью данной работы было определить влияние величины постоянного и импульсного тока на клетки биологических мембран, аналогов мембран круглого окна.

Экспериментальная установка

Для проведения экспериментов была разработана электрофизическая установка для сочетанного ионофоретического-электропоративного воздействия на биологические мембраны [18]. Схема установки представлена на рисунке 1.

Генератор импульсов, собранный по полумостовой схеме, формировал импульсы напряжения с амплитудой V_{pulse} , определяемой источником питания GPR-730H10D (GW Instek). Подключенный к средней точке моста источник питания GPR-30H10D (GW Instek) позволял регулировать напряжение смещения импульсов V_{DC} относительно нулевого потенциала. Выход генератора подключался к верхнему электроду ячейки, в которую помещался обрабатываемый образец (рис. 1б). Для ограничения сквозного тока через образец в цепь между генератором и ячейкой включался токоограничивающий резистор R_T . Таким образом, при приложении такой формы напряжения к биологической мембране под действием импульсов V_{pulse} в ней предполагается осуществление механизма электропорации, а при одновременном воздействии постоянного напряжения V_{DC} и импульсного должно происходить перемещение лекарства через образовавшиеся поры [19].

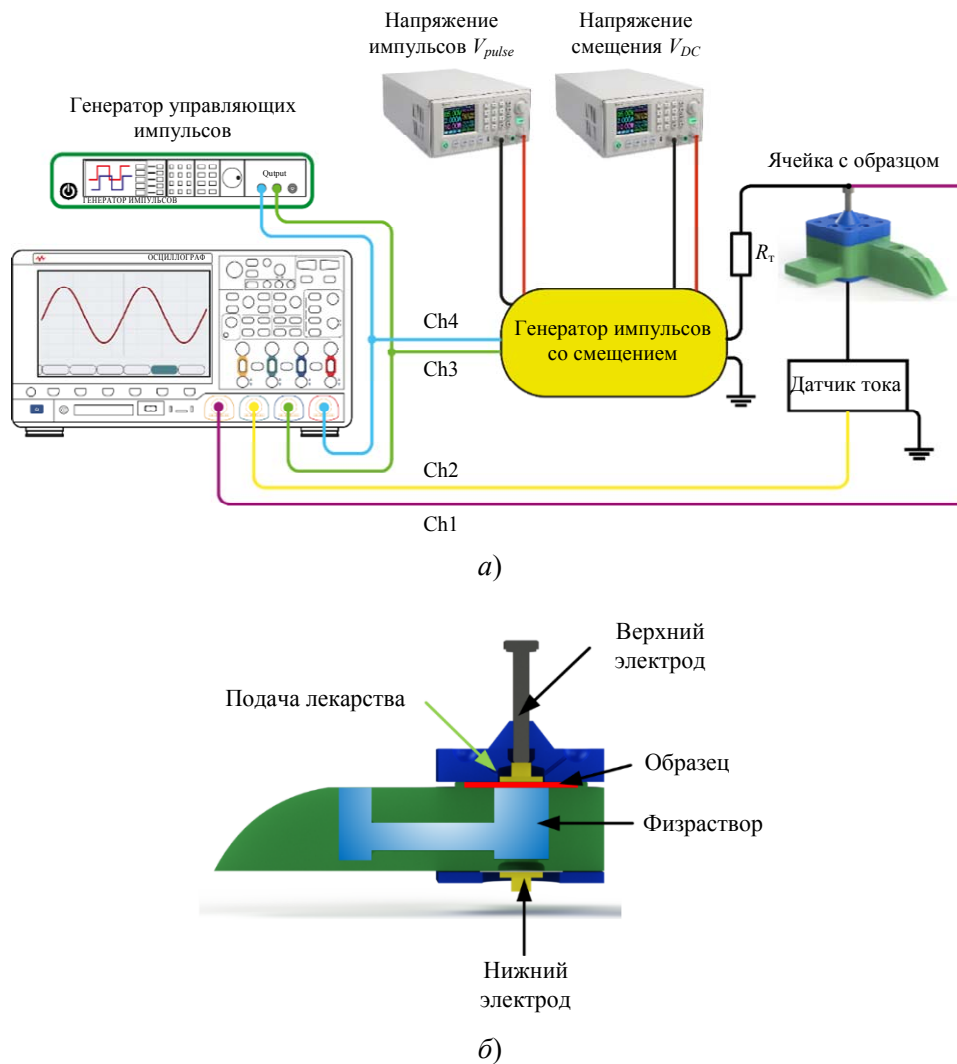


Рис. 1. Схема установки: а) – общий вид; б) – электродная ячейка в сборе

Разработанная экспериментальная установка позволила получить напряжение со следующими параметрами:

- форма напряжения: прямоугольные импульсы с постоянным регулируемым смещением;
- амплитуда импульсов V_{pulse} : 0 ± 300 В;
- постоянное напряжение смещения V_{DC} : 0 ± 300 В;
- частота подачи импульсов f_{pulse} : 1–100 000 Гц;
- скважность импульсов: 0,01–0,99.

Для тестовых экспериментов по воздействию на биологические мембраны была разработана конструкция электродной ячейки (рис. 1б) [20]. Прижимной болт вкручивается до упора через верхнюю крышку, пока не достигнет высоковольтного электрода. Биологическая мембрана располагается сверху корпуса под электродом. Герметичность кон-

струкции достигается при стягивании верхней крышки, корпуса и нижней крышки с помощью болтов через угловые крепежные отверстия. В верхней крышке, имеются отверстия, расположенные по серединам сторон и связанные с центральным отверстием каналами для доставки лекарства на поверхность мембраны.

Таким образом получается система, состоящая из двух электродов, между которыми находится биологическая мембрана и лекарство. При подаче напряжения на электроды предполагается, что под действием электрических импульсов некоторое количество лекарства будет проходить сквозь мембрану и попадет в физиологический раствор, которым заполнен корпус. Внутри корпуса имеется прорезь, по которой лекарство с физиологическим раствором попадает к крайнему отверстию.

Эксперименты с моделью мембраны круглого окна внутреннего уха человека

Для оценки жизнеспособности клеток после воздействия постоянного и импульсного тока использовались модели мембран круглого окна (ММКО) человека (рис. 2). Процесс выращивания ММКО осуществлялся в лаборатории ИБР РАН следующим образом. На стерильные круглые пьезы из PETG пластика диаметром 12 мм, находящиеся в лунках 6-х луночного планшета (SPL, Китай), были помещены коллагеновые мембраны. На поверхность наносились фибробласты человека – по 50000 клеток на вставку в 100 мкл среды, через 1 сутки среду отбирали, и наносили клетки линии NaCaT по 100000 клеток в 100 мкл среды. Затем полученные ММКО культивировали на среде DMEM/F12 (1:1, ПанЭко) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки FBS (HyClone, США) 1 % Glutamax (Gibco, США), 1% PenStrep (Gibco). Замену питательной среды осуществляли каждые 3 суток. Культивирование проводили в условиях CO₂-инкубатора с 5 % CO₂ в условиях насыщенной влажности. Средняя толщина получившийся мембраны составляла 100 ± 20 мкм [21]. Сразу после экспериментов по сочетанному воздействию электрического тока ММКО возвращали в культуральную среду и вновь помещали в условия CO₂-инкубатора.

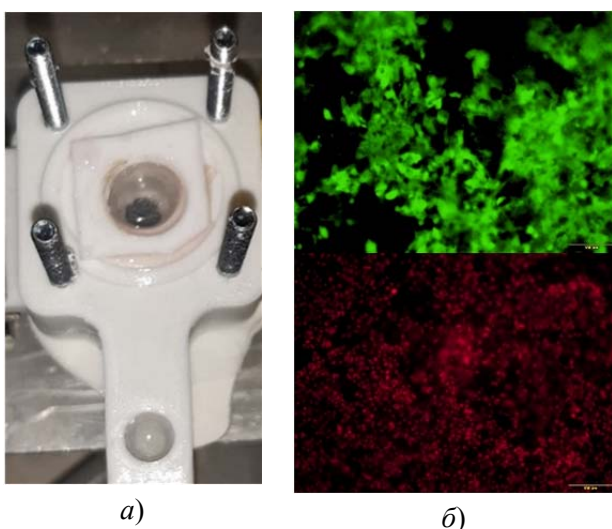


Рис. 2. Ячейка с ММКО: а) – без верхней крышки; б) – фото ММКО, окрашенной кальцием зеленым и фото ММКО, окрашенной пропидием йодидом после воздействия (постоянный ток 1 мА, импульсный ток – 1,6 мА)

На рисунке 3 показаны типичные осциллограммы тока через ячейку и напряжения на ней в ходе экспериментов по сочетанному воздействию.

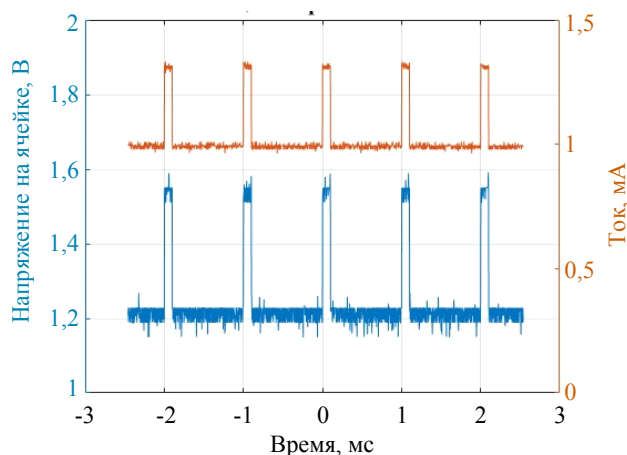


Рис. 3. Осциллограммы напряжения на электродах ячейки с ММКО и тока через нее

Первая серия экспериментов проводилась при значениях постоянного тока до 1,5 мА в отсутствии наложенных импульсов при неизменном значении прошедшего через мембрану заряда 0,5 Кл, что обеспечивалось различным временем воздействия на все образцы.

Вторая серия экспериментов проводилась при различной амплитуде импульсов напряжения и наличии постоянного напряжения смещения, что обеспечивало постоянный ток в 1 мА и импульсный ток амплитудой до 2 мА через ММКО (рис. 3). Величина прошедшего заряда через мембрану была идентична значению в первой серии и равнялась 0,5 Кл. Длительность импульсов составляла 100 мкс, частота их следования – 100 Гц.

На образцы сверху через специальные отверстия в ячейке был нанесен раствор лекарственного препарата – дексаметазона натрия фосфата в концентрации 4 мг/мл. В качестве буфера во всех экспериментах использовался физраствор 0,9 % NaCl. Контрольный образец находился в ячейке без воздействия в течение 15 минут. Через сутки после экспериментов произведено окрашивание всех образцов ММКО витальными красителями: кальцеином зеленым [19] и пропидием йодида. После окрашивания были сделаны микрофотографии, на которых по интенсивности окрашивания зеленым (для кальцеина) и по

числу окрашенных ядер красным цветом (для пропидия йодида) была проведена оценка жизнеспособности клеток образцов ММКО (рис. 4).

По результатам обработки получены зависимости активности красителей от значения тока для двух экспериментов, которые представлены на рисунке 4.

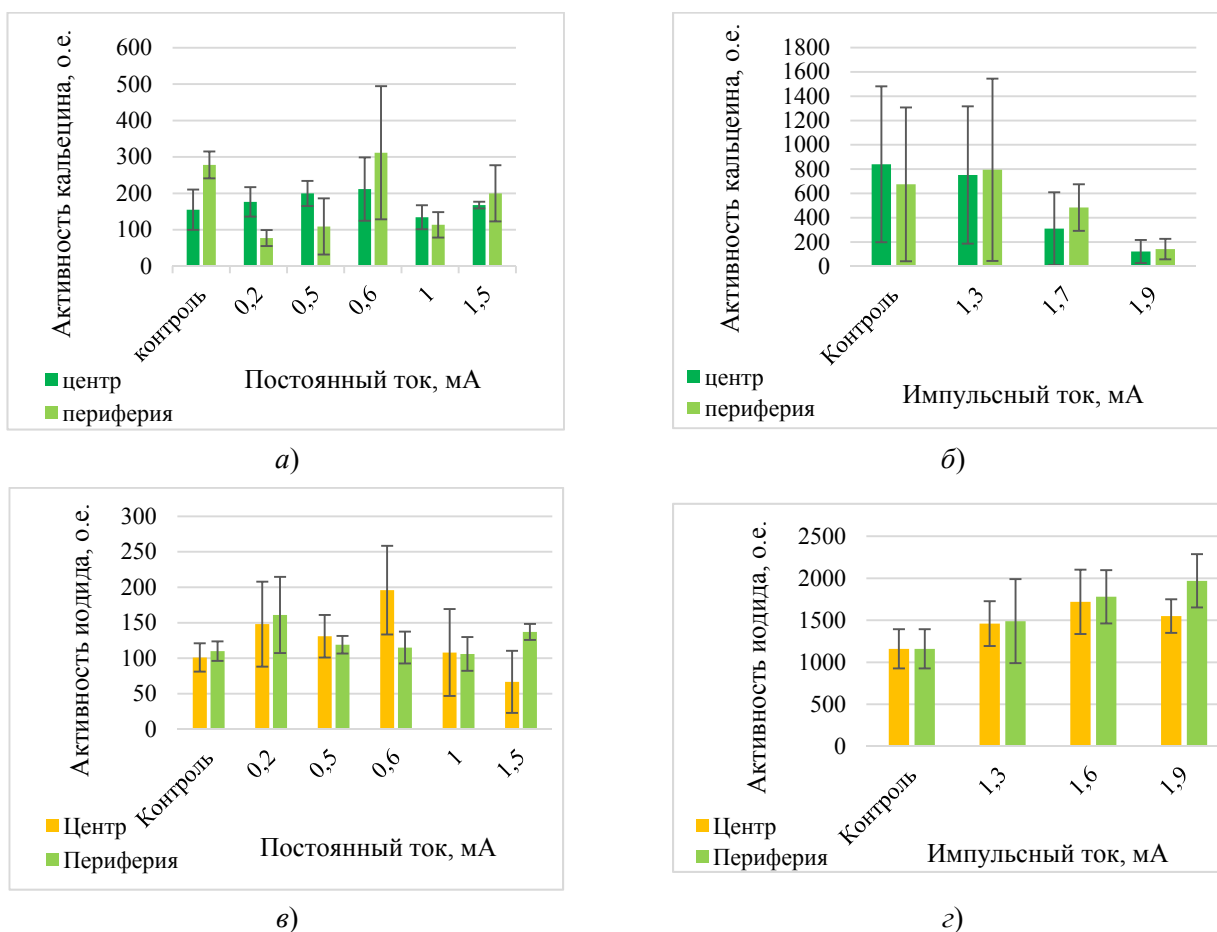


Рис. 4. Результаты экспериментов по выживаемости клеток ММКО (а, в – постоянный ток; б, г – импульсный ток)

С учетом погрешностей можно утверждать, что в диапазоне постоянного тока от 0,2 мА до 1,5 мА при перенесении через ММКО заряда 0,5 Кл заметного изменения жизнеспособности клеток не происходит (рис. 4а). Наблюдается зависимость роста гибели клеток с увеличением импульсного тока (рис. 4б). С учетом погрешностей можно утверждать, что при импульсном токе 1,9 мА число мертвых клеток больше контроля на 50 % в центре и на 100 % на периферии ММКО.

Заключение

В данной работе описана созданная импульсная электрофизическая установка для

переноса лекарственных препаратов через биологические мембраны. Принцип предложенного метода доставки основан на сочетанном электропоративном-ионофоретическом эффекте, усиления транспорта лекарства за счет формирования искусственных пор в мембране и переноса заряженных молекул препарата.

В работе представлены результаты первых экспериментов по оценке жизнеспособности биологических модельных мембран круглого окна внутреннего уха человека толщиной 100 мкм. На основании данных витального окрашивания моделей после воздействия найден оптимальный диапазон значений постоянных и импульсных токов. Экспериментально установлено, что существенного изменения жизнеспособности клеток мембран под

воздействием постоянного тока от 200 мкА до 1,5 мА не наблюдается. Тем не менее получено, что с ростом импульсного тока свыше 1,3 мА существенно повышается количество мертвых клеток.

Таким образом, на основании полученных данных дальнейшие исследования сочетанного воздействия на ММКО целесообразно проводить в рамках граничных значений постоянного тока до 1,5 мА, и импульсного – до 1,3 мА.

Работа выполнена при поддержке
Московского центра инновационных технологий
в здравоохранении, Соглашение № 2012-1/22.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Соснов А. В. и др.* / Качественная клиническая практика. 2008. № 2. С. 4–12.
2. *Liu H., Hao J., Li K. S.* / Acta Pharmaceutica Sinica B. 2013. Vol. 3. № 2. P. 86–96.
3. *Barrs D. M.* / Otolaryngologic Clinics of North America. 2004. Vol. 37. № 5. P. 955–972.
4. *Крюков А. И. и др.* / Вестник оториноларингологии. 2019. Т. 84. № 5. С. 6–14.
5. *Banerjee A., Parnes L. S.* / Otology & Neurotology. 2005. Vol. 26. № 5. P. 878–881.
6. *Plontke S. K. et al.* / The Laryngoscope. 2007. Vol. 117. № 7. P. 1191–1198.
7. *Adunka O. et al.* / Acta oto-laryngologica. 2004. Vol. 124. № 7. P. 807–812.
8. *Borenstein J. T.* / Expert opinion on drug delivery. 2011. Vol. 8. № 9. P. 1161–1174.
9. *Nadol Jr J. B. et al.* / Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. 2001. Vol. 110. № 9. P. 883–891.
10. *Kalia Y. N. et al.* / Advanced drug delivery reviews. 2004. Vol. 56. № 5. P. 619–658.
11. *Guy R. H. et al.* / Journal of controlled release. 2000. Vol. 64. № 1–3. P. 129–132.
12. *Kalaria D. R. et al.* / European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2018. Vol. 127. P. 204–212.
13. *Puc M. et al.* / Bioelectrochemistry. 2004. Vol. 64. № 2. P. 113–124.
14. *Hibino M. et al.* / Biophysical journal. 1991. Vol. 59. № 1. P. 209–220.
15. *Hibino M., Itoh H., Kinoshita Jr K.* / Biophysical journal. 1993. Vol. 64. № 6. P. 1789–1800.
16. *Hanna H. et al.* / Scientific reports. 2017. Vol. 7. № 1. P. 1–14.
17. *Pucihar G. et al.* / IEEE Transactions on Biomedical Engineering. 2011. Vol. 58. № 11. P. 3279–3288.
18. *Шериунова Е. А. и др.* / Письма в Журнал технической физики. 2021. Т. 47. № 13. С. 24–27.
19. *Шериунова Е. А., Малашин М. В., Небогаткин С. В., Воеводин В. В., Романов К. И.* Разработка электрофизической установки для сочетанного электропоративно-ионофоретического воздействия на биологические мембраны: отчет о НИР (промежуточный, этап № 1). 2022.
20. *Крюков А. И., Кунельская Н. Л., Шериунова Е. А., Небогаткин С. В., Романов К. И., Мищенко В. В., Янюшкина Е. С.* Электродная ячейка для тестовых экспериментов по активному транспорту лекарственных препаратов через биомембраны. Патент на полезную модель № 221521 (РФ). 2023.
21. *Крюков А. И. и др.* / Вестник оториноларингологии. 2023. Т. 88. № 3. С. 118.

PACS: 84.70.+p, 87.16.Dg

Development of an electrophysical installation for electroporation and assessment of the viability of biomembranes

*V. V. Voevodin¹, E. A. Vorotelak², A. I. Kryukov³, N. L. Kunelskaya³, V. V. Mishchenko²,
S. V. Nebogatkin¹, O. S. Rogovaya³, K. I. Romanov¹, A. A. Ryabini³, V. Yu. Khomich¹
and E. A. Shershunova¹*

¹ Institute for Electrophysics and Electric Power RAS
18 Dvortsovaya nab., St.-Petersburg, 191186, Russia

² Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Developmental Biology
named after. N. K. Koltsov Russian Academy of Sciences
26 Vavilova st., Moscow, 119334, Russia

³ State budgetary healthcare institution “Research Clinical Institute of Otorhinolaryngology named after. L. I. Sverzhevsky”

Bd. 2, 18A Khoroshevskoye highway, Moscow, 123007, Russia

Received 30.01.2024; revised 26.02.2024; accepted 6.03.2024

Existing invasive methods of drug delivery to the middle ear have a number of disadvantages: low concentration of the administered drug and the risk of hearing impairment. All of the above emphasizes the relevance of developing effective methods for targeted drug delivery while maintaining biological barriers. In this work, an electrophysical setup for electroporation was developed and the viability of round window membrane models was assessed.

Keywords: non-invasive drug administration, biological membranes, electroporation, electrode cell, electrophysical installation, membrane viability.

REFERENCES

1. Sosnov A. V. et al., Qualitative clinical practice, № 2, 4–12. (2008) [in Russian].
2. Liu H., Hao J. and Li K. S., Acta Pharmaceutica Sinica B **3** (2), 86–96 (2013).
3. Barrs D. M., Otolaryngologic Clinics of North America **37** (5), 955–972 (2004).
4. Kryukov A. I. et al., Bulletin of Otorhinolaryngology **84** (5), 6–14 (2019) [in Russian].
5. Banerjee A. and Parnes L. S., Otology & Neurotology **26** (5), 878–881 (2005).
6. Plontke S. K. et al., The Laryngoscope **117** (7), 1191–1198 (2007).
7. Adunka O. et al., Acta oto-laryngologica **124** (7), 807–812 (2004).
8. Borenstein J. T., Expert opinion on drug delivery **8** (9), 1161–1174 (2011).
9. Nadol Jr J. B. et al., Annals of Otology, Rhinology & Laryngology **110** (9), 883–891 (2001).
10. Kalia Y. N. et al., Advanced drug delivery reviews **56** (5), 619–658 (2004).
11. Guy R. H. et al., Journal of controlled release **64** (1–3), 129–132 (2000).
12. Kalaria D. R. et al., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **127**, 204–212 (2018).
13. Puc M. et al., Bioelectrochemistry **64** (2), 113–124 (2004).
14. Hibino M. et al., Biophysical journal **59** (1), 209–220 (1991).
15. Hibino M., Itoh H. and Kinosita Jr K., Biophysical journal **64** (6), 1789–1800 (1993).
16. Hanna H. et al., Scientific reports **7** (1), 1–14 (2017).
17. Pucihar G. et al., IEEE Transactions on Biomedical Engineering **58** (11), 3279–3288 (2011).
18. Shershunova E. A. et al., Letters to the Journal of Technical Physics **47** (13), 24–27 (2021) [in Russian].
19. Shershunova E. A., Malashin M. V., Nebogatkin S. V., Voevodin V. V. and Romanov K. I. Development of an electrophysical installation for combined electroporative-iontophoretic effects on biological membranes: research report (interim, stage № 1). 2022 [in Russian].
20. Kryukov A. I., Kunelskaya N. L., Shershunova E. A., Nebogatkin S. V., Romanov K. I., Mishchenko V. V. and Yanyushkina E. S. Electrode cell for test experiments on active transport of drugs through biomembranes № 221521 (RF). 2023 [in Russian].
21. Kryukov A. I. et al., Bulletin of Otorhinolaryngology **88** (3), 118 (2023) [in Russian].