

Специализированный учебно-научный центр
(факультет) — школа-интернат имени А.Н.
Колмогорова Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова.

**Строение и свойства комплексов анионных
липосом с поликатионными звездообразными
полимерами**

Выполнила:
ученица 10 «Н» класса
Степанова Д. А.
Научный руководитель:
Инженер-исследователь,
аспирант 2-ого года ИНЭОС РАН
Имельбаева К. М.

Москва, 2016

Оглавление

1. Введение.....	3
2. Литературный обзор.....	4
2.1 Липиды.....	4
2.2 Строение и свойства липосом.....	4
2.3 Способы получения липосом.....	6
2.4 Применение.....	7

2.5 Носители.....	7
3. Экспериментальная часть.....	9
3.1 Используемые реагенты.....	9
3.1.1 Фосфолипиды и ПАВ.....	9
3.1.2 Полимеры.....	9
3.1.3 Низкомолекулярные реагенты.....	9
3.1.4 Вода.....	9
3.2 Объекты исследования.....	11
3.2.1 Получение комплексов анионных липосом и поликатионных звездообразных полимеров.....	12
3.2.2 Получение флуоресцентно меченых липосом.....	12
3.3. Методы исследования.....	12
3.3.1 Динамическое светорассеяние.....	12
3.3.2 Флуориметрия.....	12
3.3.3 Препаративное центрифугирование.....	12
4. Обсуждение результатов.....	13
4.1 Анионные липосомы.....	13
4.2 Формирование комплексов поликатионных звездообразных полимеров с малыми анионными ЖК липосомами и изучение их свойств.....	13
4.3 Количественное оценивание связывания липосом с поликатионным носителем.....	14
4.4 Устойчивость комплексов поликатионных «звезд» с малыми анионными ЖК липосомами в водно-солевых средах.....	15
4.5 Образование комплексов твердых анионных липосом с поликатионными «звездами».....	17
4.6 Количественное оценивание связывания «твердых» липосом с поликатионным носителем.....	19
4.7 Устойчивость комплексов твердых анионных липосом с поликатионными «звездами» в водно-солевых средах.....	20
5. Выводы.....	23
6. Список литературы.....	24

1. Введение

В начале 60-х годов английский ученый Алекс Бэнгхем изучал структуру коллоидных дисперсий, образующихся при набухании фосфолипидов в избытке воды и заметил слоистые частички, похожие на мембранные структуры. Продолжая изучать эти структуры, Бэнгхем обнаружил, что ионы, находившиеся на момент образования пузырьков в водном растворе, попадали в полость везикул и в течение длительного времени там удерживались. Так впервые липосомы были введены в историю науки. [1]

На данный момент в литературе накоплено большое количество информации о строении и свойствах липосом. Изучены способы связывания липосом и поликатиона, слияние и разрушение мембран, индуцированных полимером. Рассмотрены свойства таких комплексов, исследованы разные виды поликатионных носителей.

Липосомы и липосомальные комплексы – очень перспективные объекты в области медицины. Они снижают токсичность препаратов, увеличивают их биодоступность, дают возможность нацеленной доставки лекарств к очагу поражения.

Но, несмотря на значительный прогресс в области исследования и применения липосом, остается нерешенным ряд вопросов, изучение которых представляет большое значение для дальнейшего применения липосом в качестве наноконтейнеров. В частности, это вопрос применения липидов с разными температурами фазовых переходов.

Для решения этих проблем в данной работе были изучены строение и свойства комплексов, сформированных из разных видов анионных липосом и поликатионных звезд.

2. Литературный обзор

2.1 Липиды

Липиды – это жирные кислоты и их фосфо- и азотосодержащие производные. [2] Это нерастворимые в воде вещества, в молекулу которых входят, как полярные (гидрофильные), так и неполярные (гидрофобные) группировки. Такие молекулы называют амфифильными.

Будучи одним из основных компонентов биологических мембран, липиды влияют на их проницаемость, участвуют в передаче нервного импульса, создании межклеточных контактов. [3] Такое разнообразие функций обусловлено большим количеством подклассов липидов.

Из-за своего «двоякого» отношения к воде липиды (в частности, фосфолипиды) могут образовывать в воде мембраны и, стремясь максимально «спрятать» гидрофобную часть от воды, образуют мицеллы или полые структуры, состоящие из бислоя липидов. Такие пузырьковые образования получили название «липосомы».

При определенных температурных условиях (зависят от природы полярных головок, длины и ненасыщенности жирно-кислотных цепей) с пузырьковыми образованиями происходят фазовые переходы. Основной фазовый переход связан с переходом углеводородных цепей из гелеобразного в жидкокристаллическое состояние. Для ЖК липидов характерно явление флип-флопа. Это переход липида с одной стороны бислоя на другую. Скорость флип-флопа зависит от устойчивости фазового состояния данных липидов и от других внешних факторов (например, кулоновские силы стимулируют его возникновение). [4] Так же перемены температуры приводят к изменению геометрической организации бислоя и фазовым разделениям бислоев, состоящих из смеси липидов. [3]

2.2 Структура и свойства липосом

Итак, липосомы – полые структуры, образующиеся в смесях фосфолипидов с водой. Из-за амфифильного характера бислоя, во внутреннюю полость можно включать гидрофильные вещества, а в бислое – гидрофобные (рис. 1). [1]

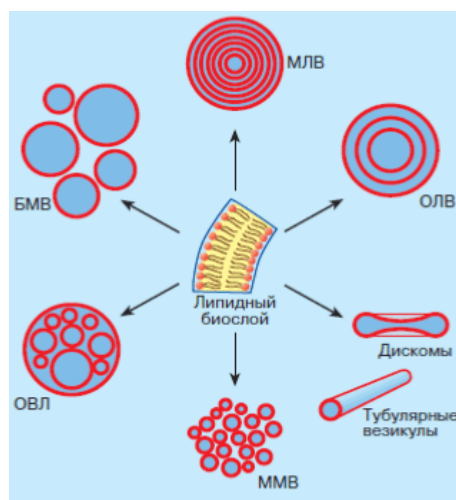
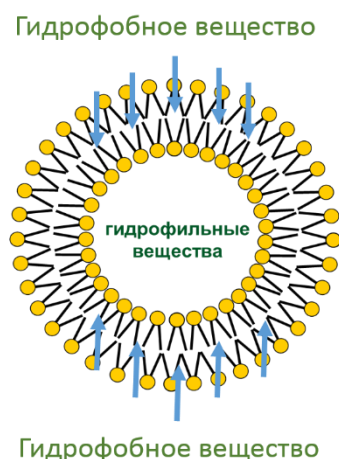


Рис. 1 Структура липосомы

Рис. 2 Классификация липосом

1. Моноламеллярные

- Малые моноламеллярные везикулы (ММВ)
- Большие моноламеллярные везикулы (БМВ)

2. Мультиламеллярные

1) Концентрические

- Мультиламеллярные везикулы (МЛВ)
- Олиголамеллярные везикулы (ОЛВ)

2) Неконцентрические

- Олиголамеллярные липосомы (ОЛЛ)

3. Несферические

- Тубулярные везикулы
- Дискообразные везикулы

Вариаций липосом огромное количество. Первыми были получены многослойные или мультиламеллярные везикулы. Они состояли из большого количества концентрических липидных бислоев, разделенных между собой водной прослойкой (их структуру можно сопоставить со структурой лука), и имели относительно крупные размеры (до 2,5 мкм). Мультиламеллярные липосомы весьма устойчивы и способны храниться несколько дней в холодильнике. Также степень инкапсуляции в такие липосомы исключительно высока (до 89%). [3] Другой крайностью большого разнообразия таких сфер являются однослойные липосомы, размеры которых очень малы (от 0,025 мкм). [5] При этом, внешне липосомы не всегда выглядят как сферические образования, они могут иметь вид тонких трубок (тубулярные липосомы) или быть уплощенными (дискообразными). [1]

Из-за своей липидной оболочки липосомы обладают текучестью и гибкостью. Именно это обуславливает их устойчивость к механическим воздействиям и сохраняет целостность липосомы.

Одним из важнейших свойств липосом является высокая биосовместимость, обусловленная очевидным «родством» по химическому составу с составом мембраны живой клетки. Важным фактором является относительная легкая биodeградируемость липосом (разрушаемость под действием обычных ферментов или факторов). При этом в

пути следования сферические частицы не высвобождают наружу инкапсулированное вещество. [6]

2.3 Способы получения липосом

Для приготовления липосом обычно используют фосфолипиды, которые подразделяются на фосфоглицериды, состоящие из остатка глицерина, присоединенных к нему двух жирнокислотных молекул и фосфорилированного спирта, и на гликофинголипиды – липиды, содержащие остатки сахаров. [7]

Одним из самых популярных способов получения небольших моноламеллярных липосом является ультразвуковая обработка суспензий мультиламеллярных липосомных везикул. Главным недостатком такого способа является низкая степень инкапсуляции, возможное разрушение фосфолипидов и соединений, которые надо включить во внутренний объем, металлическое загрязнение зондом наконечника и существование многослойных липосом наряду с однослойными. [8]

Экструзия: способ, при котором многоламеллярные липосомы продавливают под давлением ≈ 140 МПа при 4°C через маленькое отверстие. Это очень быстрый метод. Получившиеся липосомы немного больше, чем те, которые получают озвучиванием. Минусы заключаются в том, что такая температура трудна для достижения и объемы, с которыми приходится работать, относительно малы. [9]

Метод замораживания-оттаивания: метод, при котором в результате цикла замораживания фосфолипидных дисперсий с последующим оттаиванием образуются липосомы с высоким процентным включением инкапсулированных веществ. Размеры липосом могут увеличиваться путем слияния. [10]

Эффективность той или иной технологии определяется по количеству инкапсулированного продукта, выраженному в процентах от общего объема лекарственных веществ в растворе. [11]

2.4 Применение

Первое применение липосомальные везикулы нашли в исследованиях, связанных с моделированием биологических мембран. С их помощью были установлены основные закономерности транспорта веществ через мембрану, показана важная роль фазовых переходов в функционировании мембран. [3]

Липидные везикулы находят применение в медицине в качестве средств доставки фармакологически активных соединений к клеткам-мишеням. Заслуживает упоминания их использование для диагностических и аналитических целей. В ядро липосомы можно

включать различные радиоактивные, рентгеноконтрастные, парамагнитные вещества, а также вещества, отражающие ультразвук, улучшающие качество изображений в таких распространенных методах диагностики, как компьютерная томография, рентгенография и ультразвуковое зондирование. [1]

Использование липосом в области генной инженерии в качестве «доставщиков» нужных генов может оказаться полезным для терапии наследственных заболеваний, вызванных генными дефектами. [12]

На сегодняшний день липосомы активно используются в исследованиях свойств биологических мембран, для транспорта веществ, в качестве реакционных систем в биохимии, фармации, иммунологии и биотехнологии.

2.5 Носители липосом

Казалось бы - были найдены идеальные контейнеры для доставки лекарственных препаратов. Однако, при дальнейшем использовании липосом возникла существенная проблема: хоть внутреннее содержимое липосомы практически не ограничено химической природой (из-за свойств бислоя), но оно ограничено объемом самой везикулы, что обуславливает довольно низкий терапевтический эффект. Значит, надо сконцентрировать липосомы в одном месте. Практика показала, что в настоящий момент не существует носителя, подходящего для таких целей. Сейчас используют такие методы иммобилизации липосом:

1. Иммобилизация липосом на коллоидном носителе нанометрового размера. Такое закрепление на твердом носителе обычно сопровождается их разрушением и неконтролируемым выходом инкапсулированного вещества. [13]

2. Поликатионные щетки, состоящие из 100 нм полистирольных частиц с осаженными катионными макромолекулами на их поверхности. Важно отметить, что в таком случае нет прямого контакта липосомы с носителем, что позволяет сохранить целостность везикулы. [13] Но практика показала, что большое полистирольное ядро «щетки» токсично, поэтому его использование невозможно в дальнейшем. [14]

3. Недавно был предложен способ получения комплексов липосом со звездообразными полимерами. Цитотоксичность такого носителя ниже, чем у щетки, и целостность липосом при адсорбции на «звезду» сохраняется. [15]

Отсюда же и вытекает **основная цель данной работы**: Получение комплексов жидкокристаллических и твердых анионных липосом с поликатионными звездообразными полимерами и исследование влияния флип-флопа и латеральной сегрегации на процессы комплексообразования.

Таким образом, возможно создание нетоксичного мультилипосомального комплекса для более эффективной доставки лекарственных средств.

3. Экспериментальная часть

3.1. Используемые реагенты

3.1.1 Фосфолипиды и ПАВ.

1-пальмитоил-2-олеоил-глицеро-3-фосфо-L-серин (натриевая соль), раствор в хлороформе и этаноле (1:1) с концентрацией 10 мг/мл (ПОФС); 1,2-диолеоил-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(лиссамин-сульфородамин Б) (аммонийная соль); 1,2-дипальмитоил-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ); 1,2-диолеоил-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ) - липиды фирмы Avanti Polar Lipids. Все липиды и ПАВ использовали без дополнительной очистки.

3.1.2 Полимеры

Поликатионный звездообразный полимер - поли-триметиламиноэтилметакрилат иодид, центральное ядро которого состоит из наноразмерной песчинки. «Звезда» имеет 24 луча, степень полимеризации каждого 240. Предоставлено Ф. Плампером, институт Байройта (Германия).

3.1.3 Низкомолекулярные реагенты

В работе использовали хлороформ (CHCl_3) марки х.ч. «Реахим» (Россия) без дополнительной очистки, раствор этанола ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) с концентрацией 95% «Ферейн» (Россия).

Буфер ТРИС с $\text{pH}=7$ готовили, используя трис (трис-(гидроксиметил)-аминометан) марки х.ч., «Реахим» (Россия).

Для приготовления 4М раствора хлорида натрия использовали NaCl марки х.ч. «Реахим» (Россия) без дополнительной очистки.

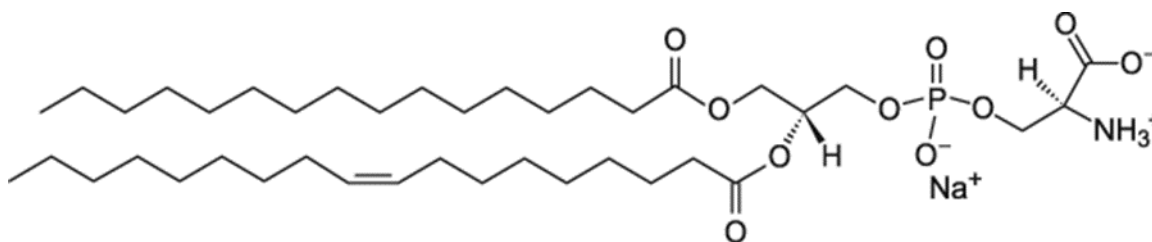
Концентрированная соляная кислота «Реахим» (Россия).

3.1.4 Вода

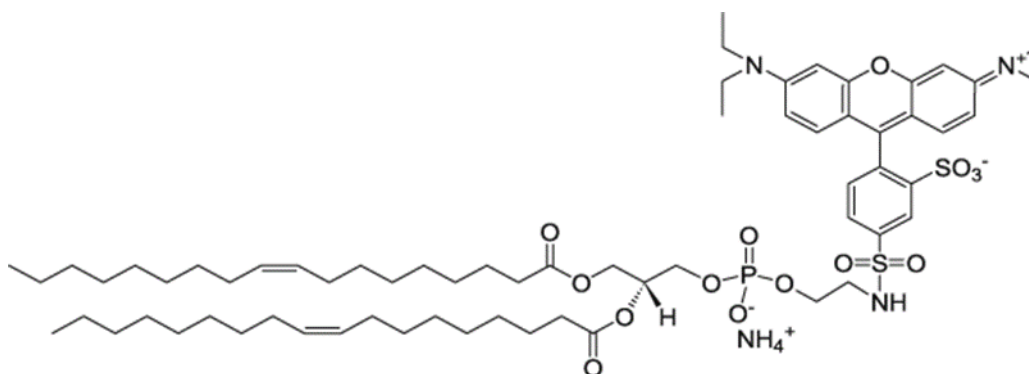
Воду очищали двойной перегонкой с последующим пропусканием через систему «Milli-Q» фирмы «Миллипор» (США), включающую ионообменные, адсорбционные колонки для глубокой очистки от органических примесей и фильтры для удаления крупных частиц. Очищенная таким образом вода имела удельную электропроводность $0.56 \cdot \mu\text{См} / \text{см}$.

Структурные формулы используемых веществ приведены ниже:

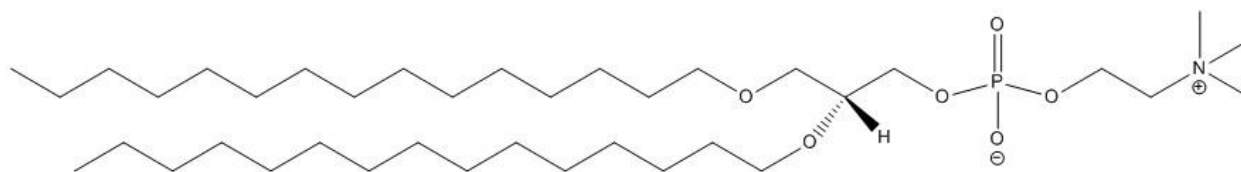
1-пальмитоил-2-олеоил-глицеро-3-фосфо-L-серин: (ПОФС)



1,2-диолеоил-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиссаминсульфородамин Б) (аммонийная соль):



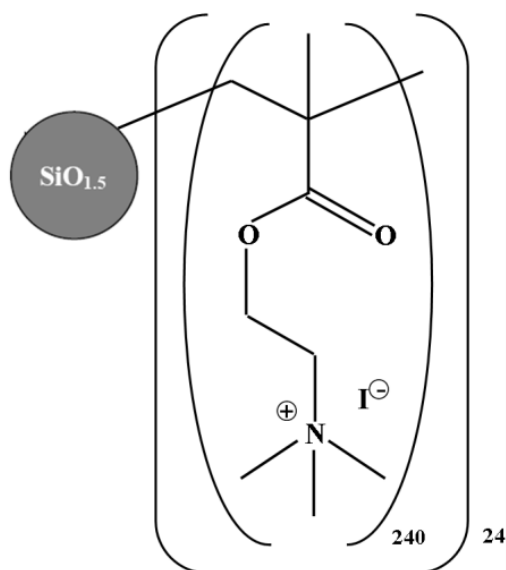
1,2-дипальмитоил-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ):



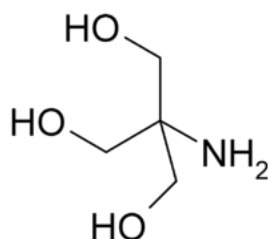
1,2-диолеоил-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ):



Поликатионный звездообразный полимер поли-триметиламиноэтилметакрилат иодид:



Трис:



3.2 Объекты исследования

В работе использовали липосомы различного состава. Малые моноламеллярные жидкокристаллические липосомы составов ПОФС/ДОФХ и «твердые» липосомы ПОФС/ДПФХ с долей анионного липида 0.1 получали методом озвучивания. Для этого растворы липидов в хлороформе смешивали в круглодонной стеклянной колбе и тщательно удаляли органический растворитель на вакуумном роторном испарителе "Laborota 4000" фирмы "Heidolph" (Германия). Образующуюся тонкую пленку липидов диспергировали в необходимом количестве буфера (ТРИС, 10^{-3} М, рН=7) и перемешивали, используя скоростную мешалку *Vortex-Genie*. Таким образом получали суспензию мультиламеллярных липосом. После этого на препарат воздействовали ультразвуком частоты 22 кГц в течение 600 с (2×300 с) в непрерывном режиме при постоянном охлаждении водой. Использовали ультразвуковой диспергатор фирмы "Cole-Parmer Instrument" (США). Полученные липосомы отделяли от титановой пыли на центрифуге "J-11" фирмы "Beckman" (Австрия) в течение 5 минут при скорости 12 тыс. об/мин и использовали в течение трех суток. Жидкокристаллические липосомы готовились при комнатной температуре, гелеобразные – при 45°C.

3.2.1 Получение комплексов анионных липосом и поликатионных звездообразных полимеров

Для получения комплексов использовали раствор «звезд» с концентрацией 10^{-3} осново-моль/л и суспензию липосом. В раствор звезд добавляли необходимое количество липосом, комплексы формировались самопроизвольно в растворе благодаря кулоновским взаимодействиям.

3.2.2 Получение флуоресцентно меченых липосом

Для получения меченых липосом в процессе формирования липидной пленки к смеси растворов липидов добавляли 1,2-диолеоил-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(лиссаминсульфородамин Б), мольная доля которого составляла 0,005.

3.3 Методы исследования

3.3.1 Динамическое светорассеяние

Гидродинамический диаметр (размер) липосом, полипептидных везикул и их комплексов оценивали с помощью прибора *Brookhaven 90 Plus (Brookhaven Instruments Company, США)* при фиксированном угле (90°).

3.3.2 Флуориметрия

Измерение интенсивности флуоресценции растворов липосом проводили на спектрофлуориметре *F-4000 (Hitachi, Япония)*. Использовали кюветы шириной 1 см. Измерения проводились в термостатируемой ячейке.

3.3.3. Препаративное центрифугирование

Для осаждения комплексов поликатионных звездообразных полимеров и анионных липосом использовалось центрифугирование (18000 об/мин.), которое проводилось на центрифуге “J2-21” фирмы “Beckman”(Австрия) в течение 40 минут под вакуумом.

4. Обсуждение результатов

4.1 Анионные липосомы

Размер сформированных по описанной методике в экспериментальной части анионных липосом установили с помощью метода динамического светорассеяния. Диаметр полученных липосом составил 35-40 нм.

4.2 Формирование комплексов поликатионных звездообразных полимеров с малыми анионными ЖК липосомами и изучение их свойств

Регистрацию размеров комплексов поликатионных звездообразных полимеров с анионными липосомами устанавливали методом динамического светорассеяния. Были получены зависимости гидродинамического диаметра частиц в зависимости от концентрации добавленных липосом.

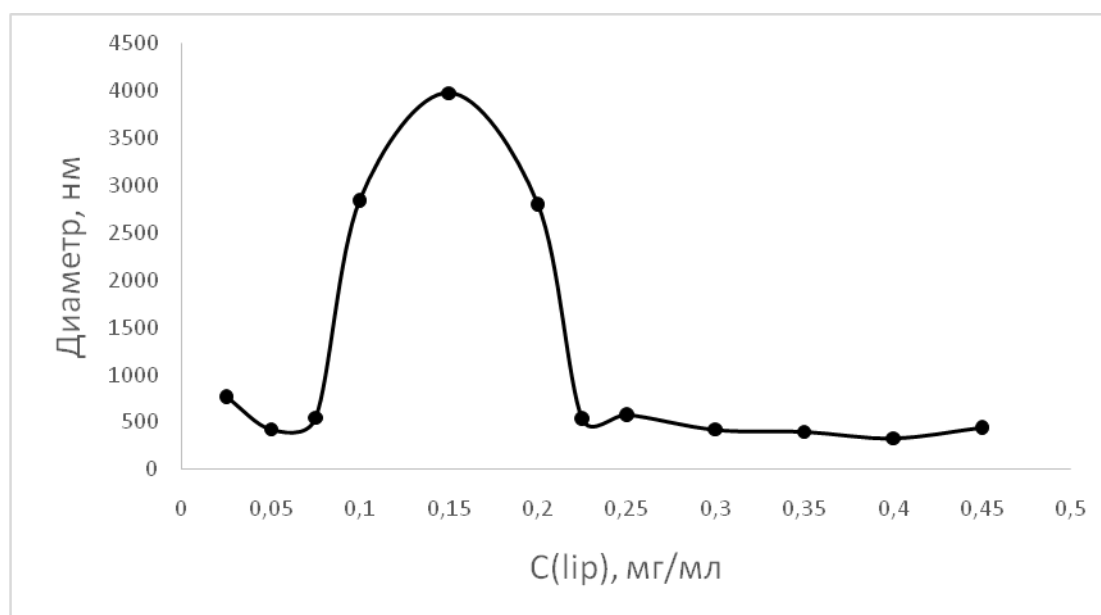


Рис. 3 Зависимость размера частиц комплекса липосомы ПОФС/ДОФХ-«звезды» от концентрации добавленных липосом; $\nu(\text{ПОФС}) = 0,1$;

$[N^+]$ (концентрация заряженных групп) = $1,25 \times 10^{-5}$ осново-моль/л; ТРИС рН = 7; $T = 25^\circ\text{C}$.

На графике (рис. 3) видна тенденция увеличения размеров комплексов при увеличении концентрации анионных липосом. Максимальный размер комплексов достигался при полной нейтрализации поверхностного заряда носителя. Концентрация липосом с $\nu(\text{ПОФС})=0,1$, необходимая для полной нейтрализации поверхностного заряда везикул, составляет 0,15 мг/мл. Очевидно, что разрушение агрегатов обусловлено появлением избыточного отрицательного заряда, привнесенного анионными липосомами.

4.3 Количественное оценивание связывания липосом с поликатионным носителем

Для количественной оценки связывания «звезд» с анионными липосомами ПОФС/ДОФХ был проведен следующий эксперимент: были сформированы комплексы различного состава флуоресцентно меченых липосом с поликатионными звездами. Далее частицы комплекса были отделены от раствора путем центрифугирования (18000 об./мин., 40 мин.), а оставшийся раствор проанализирован на наличие липосом методом флуоресцентной спектроскопии. На рис. 4 приведена зависимость относительной интенсивности флуоресценции надосадочной жидкости от концентрации добавленных липосом.

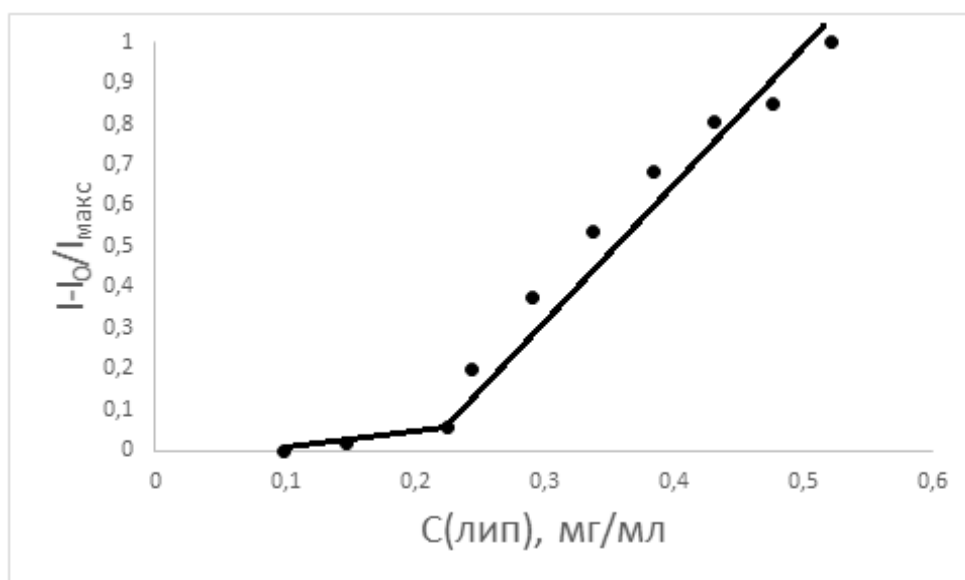


Рис.4 Зависимость относительной интенсивности флуоресценции надосадочной жидкости от концентрации добавленных липосом. $v_{\text{ПОФС}}=0,1$, $[N^+]=1,67 \times 10^{-5} \text{ M}$, Буфер ТРИС pH=7.

На рис. 4 видно, что наблюдается полное связывание липосом в комплекс вплоть до достижения предельной концентрации липосом равной 0,225 мг/мл, после которой связывание прекращается, а количество липосом в надосадочной жидкости возрастает линейно. Таким образом, увеличение концентрации липосом в супернатанте комплексов обусловлено исключительно несвязанными липосомами, а комплекс находится в осадке, не внося вклада в значение интенсивности флуоресценции.

Концентрация липосом, при которой в супернатанте начинают появляться неадсорбированные частицы, соответствует максимально возможному количеству липосом, которое может связаться со «звездой» ($C_{\text{связ}}$). Количественная оценка показывает, что адсорбация липосом на поверхность «звезд» не прекращается в точке

электронейтральности комплекса и продолжается вплоть до полной перезарядки комплекса, $C_{\text{связ}}=0.225$ мг/мл, концентрация в точке электронейтральности $C_{\text{лип}}=0.15$ мг/мл. Таким образом, количество липосом, способных предельно адсорбироваться на единичной молекуле «звезды», превышает необходимое для нейтрализации поверхностного заряда «звезды». На основании данных, полученных в эксперименте, описанном выше, был сделан расчет числа липосом, приходящихся на одну макромолекулу (W).

Последовательность расчета.

- Средний диаметр липосом (D) 38,4 нм
- Площадь одного липида в бислое (S) около 0,7 нм²
- Масса ДОФХ $M_{\text{ДОФХ}}=786$ г/моль, ПОФС $M_{\text{ПОФС}}=784$ г/моль
- Концентрация связывания предельно адсорбирующихся липосом ($C_{\text{связ}}$) 0,225 мг/мл
- $[N^+]=1,67 \times 10^{-5}$ осново-моль/л
- Каждая «звезда» несет в среднем 24 (*число лучей*), 240 (*степень полимеризации луча*) = 5760 заряженных групп

По известным данным находим:

$$W = [C_{\text{связ}} / (0.1 \times M_{\text{ПОФС}} + 0.9 \times M_{\text{ДОФХ}}) \times N_A / (\pi \times D^2 \times 2 / S)] / ([N^+] / 5760 \times N_A),$$

где N_A – число Авогадро

Для описанной выше системы $W = 7$ штук

4.4 Устойчивость комплексов поликатионных «звезд» с малыми анионными ЖК липосомами в водно-солевых средах

Взаимодействие между анионными липосомами и поликатионными носителями обусловлено кулоновскими силами, поэтому важно оценить устойчивость таких комплексов в водно-солевых средах.

За образованием и последующей диссоциацией комплексов флуоресцентно меченых липосом со «звездами» следили по изменению относительной интенсивности флуоресценции (в мембрану липосом был включен флуоресцентно меченый липид). Известно, что поликатионы являются эффективными тушителями флуоресценции [16], поэтому процесс формирования комплекса должен сопровождаться уменьшением флуоресценции, а диссоциация комплекса в растворе соли – ее возгоранием.

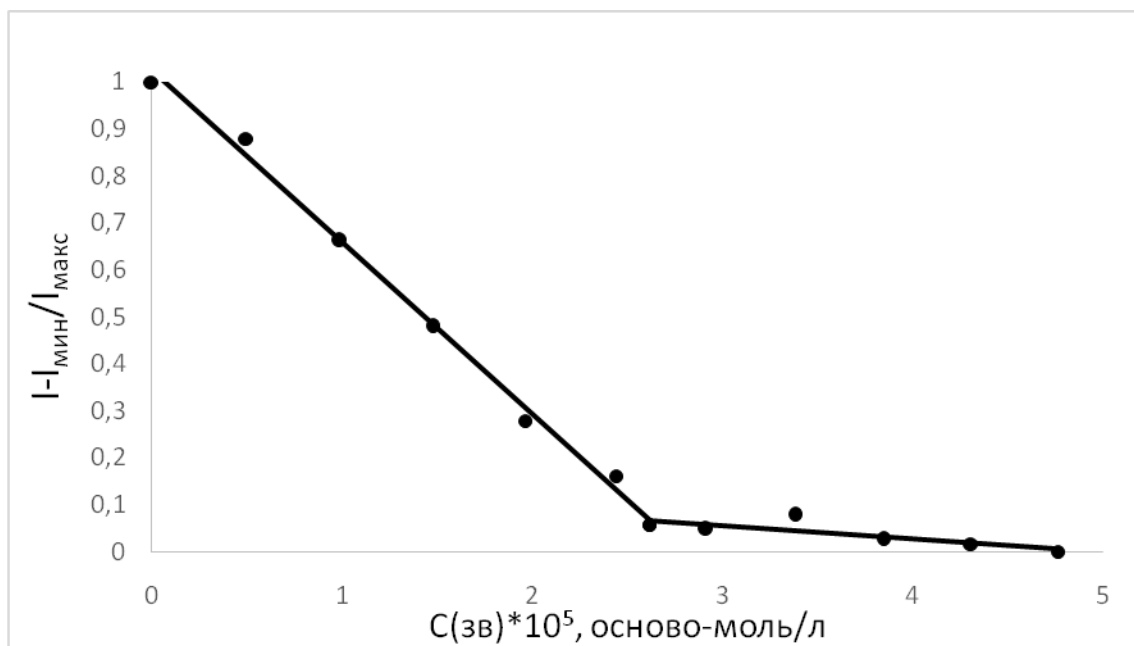


Рис. 5 Зависимость относительной интенсивности флуоресценции суспензии комплекса липосом ПОФС/ДОФХ и «звезд» от концентрации «звезд»; $C_{\text{лип}} = 0.47$ мг/мл; ТРИС рН = 7; $T = 25^\circ\text{C}$.

На рис. 5 представлена зависимость относительной интенсивности флуоресценции комплексов липосомы – «звезда» от концентрации добавленного в систему полимера. Как видно, при взаимодействии анионных липосом со «звездами» наблюдается постепенное тушение флуоресценции. Значение флуоресценции по мере увеличения концентрации «звезд» выходило на плато.

Для исследования устойчивости полученного таким образом комплекса в солевом растворе добавляли хлорид натрия. Зависимости приведенной интенсивности флуоресценции от концентрации соли представлены на рис. 6. Видно, что комплекс «звезд» и липосом полностью диссоциирует в солевом растворе при достижении концентрации соли 0,25 М.

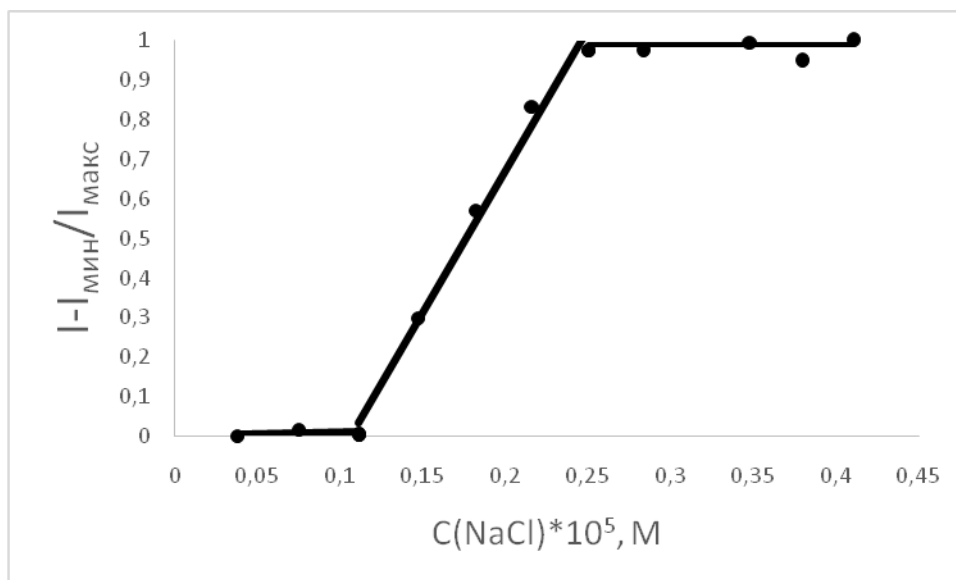


Рис. 6. Зависимость приведенной интенсивности флуоресценции суспензий комплексов липосом ПОФС/ДОФХ и «звезд» от концентрации добавленной соли; $C_{\text{лип}} = 0.47 \text{ мг/мл}$; $[N^+] = 4.38 \times 10^{-5} \text{ осново-моль/л}$; ТРИС рН = 7; $T = 25^\circ\text{C}$.

Таким образом, комплексы оказываются устойчивыми к диссоциации на исходные компоненты при ионной силе физиологического раствора.

4.5 Образование комплексов твердых анионных липосом с поликатионными «звездами»

Ранее рассмотрены комплексы «звезд» с липосомами, мембрана которых находилась в жидкокристаллическом состоянии, то есть липиды в них при комнатной температуре образуют жидкую фазу, благодаря чему возможен флип-флоп и латеральное перемещение липидов в мембране. Если использовать липид, который при комнатной температуре находится в твердой фазе, то флип-флопа и латеральной сегрегации не будет происходить. Для выявления роли подвижности липидов в мембране были изучены комплексы поликатионных «звезд» и липосом, в которых электронейтральный ДОФХ был заменён на электронейтральный ДПФХ, формирующий липосомы, мембрана которых находится в твердофазном состоянии при комнатной температуре.

Измерение размеров формируемых комплексов отражено на графике, представленном на рис. 7. Были получены зависимости гидродинамического диаметра частиц в зависимости от концентрации липосом.

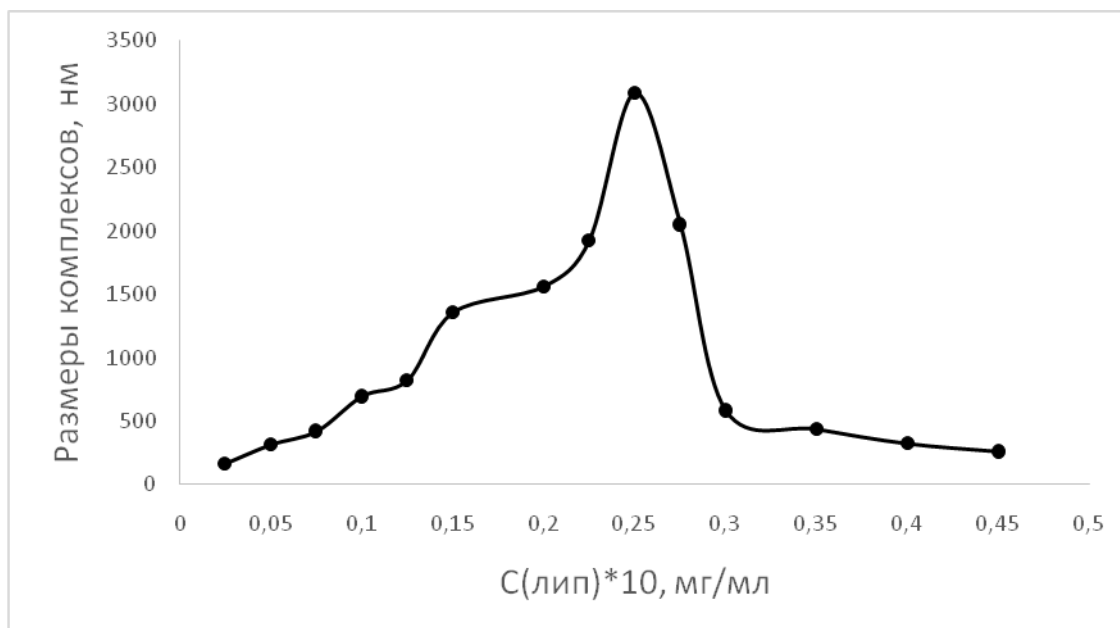


Рис. 7 Зависимость размера частиц комплекса твердые липосомы ПОФС/ДПФХ - «звезда» от концентрации добавленных липосом; Состав липосом $\nu(\text{ПОФС}) = 0.1$, $[N+] = 1.25 \times 10^{-5}$ осново-моль/л; ТРИС $\text{pH} = 7$; $T = 25^\circ\text{C}$

По мере добавления липосом вследствие их адсорбции на поверхности «звезд», наблюдается рост размера комплекса. При малых концентрациях липосом размер растет мало, но по мере приближения к точке электронейтральности начинается образование агрегатов. Концентрация липосом $\nu(\text{ПОФС})=0.1$, при которой достигается точка электронейтральности, составляет 0.25 мг/мл. В эксперименте с жидкокристаллическими липосомами точка электронейтральности достигалась при концентрации липосом = 0.15 мг/мл. Это доказывает влияние флип-флопа на количественное связывание липосом со «звездой». Как говорилось выше, кулоновские взаимодействия могут стимулировать флип-флоп. Это значит, что в «жидких» липосомах происходит миграция заряженных липидов в сторону поликатиона, на липосоме скапливается отрицательный заряд, вследствие чего одна липосома, сформированная из ЖК липидов, может нейтрализовать большее количество заряженных групп «звезды», чем «твердая» липосома, заряд на которой распределен более равномерно (обуславливается отсутствием флип-флопа).

Максимальный размер агрегатов достигался при полной нейтрализации поверхностного заряда липосом. Дальнейшее введение липосом приводит к уменьшению размера частиц вследствие дезагрегации из-за перезарядки комплекса. Очевидно, что разрушение агрегатов обусловлено появлением избыточного отрицательного заряда, привнесенного анионными липосомами.

4.6 Количественное оценивание связывания «твердых» липосом с поликатионным носителем.

Как и с предыдущим образцом, для количественной оценки связывания твердых анионных липидов со «звездой» провели следующий эксперимент: были сформированы различные комплексы липидов ПОФС/ДПФХ с мольной долей заряженных липидов 0,1. Далее частицы комплекса были отделены от раствора путем центрифугирования (18000 об./мин., 40 мин.), а супернатант проанализирован на наличие липосом методом флуоресцентной спектроскопии.

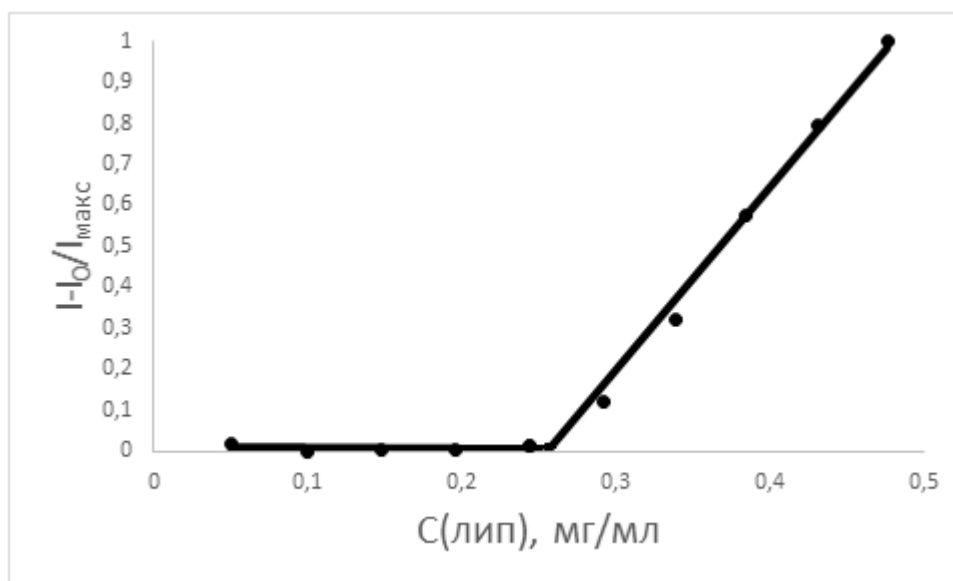


Рис. 8 Зависимость относительной интенсивности флуоресценции надосадочной жидкости от концентрации добавленных липосом. $v_{(\text{ПОФС})}=0,1$, $[N^+]=1,67 \times 10^{-5} \text{ М}$, Буфер ТРИС $\text{pH}=7$.

На рис. 8 видно, что наблюдается полное связывание липосом в комплекс вплоть до достижения предельной концентрации липосом примерно равной 0,26 мг/мл, после которой связывание прекращается, а количество липосом в надосадочной жидкости возрастает линейно, и линейно увеличивается интенсивность флуоресценции. Таким образом, увеличение концентрации липосом в супернатанте комплексов обусловлено исключительно несвязанными липосомами, а комплекс находится в осадке, не внося вклада в значение относительной интенсивности флуоресценции.

Вследствие отсутствия флип-флопа заряд на липосоме ПОФС/ДПФХ распределен более равномерно по сравнению с липосомами, состоящими из «жидких» липидов. Этим обуславливается большее количество связанных липосом с одной «звездой». На

основании данных, полученных в эксперименте, описанном выше, был сделан расчет числа липосом, приходящихся на одну макромолекулу (W).

Последовательность расчета.

- Средний диаметр липосом (D) 40 нм
- Площадь одного липида в бислое (S) около 0,7 нм²
- Масса ДПФХ $M_{\text{ДПФХ}}=734$ г/моль, ПОФС $M_{\text{ПОФС}}=784$ г/моль
- Концентрация связывания предельно адсорбирующихся липосом ($C_{\text{связ}}$) 0,26 мг/мл
- $[N+] = 1,67 \times 10^{-5}$ осново-моль/л
- Каждая «звезда» несет в среднем 24 (число лучей), 240 (степень полимеризации луча) = 5760 заряженных групп

По известным данным находим:

$$W = [C_{\text{связ}} / (0.1 \times M_{\text{ПОФС}} + 0.9 \times M_{\text{ДПФХ}}) \times N_A / (\pi \times D^2 \times 2 / S)] / ([N+] / 5760 \times N_A),$$

где N_A – число Авогадро

Для описанной выше системы $W = 8$ штук.

4.7 Устойчивость комплексов твердых анионных липосом с поликатионными «звездами» в водно-солевых средах

Так же как в предыдущих системах, за образованием и последующей диссоциацией комплексов следили по изменению относительной интенсивности флуоресценции (в мембранах липосом содержался флуоресцентно меченый липид).

На рис. 9 представлена зависимость относительной интенсивности флуоресценции комплексов твердые липосомы (ДПФХ/ПОФС; $\nu(\text{ПОФС})=0.1$)– «звезда» от концентрации добавленного в систему полимера. Как и для комплексов с «жидкими» липосомами, при увеличении концентрации «звезд» в растворе наблюдается постепенное тушение флуоресценции. Значение относительной флуоресценции по мере добавления «звезд» выходит на плато.

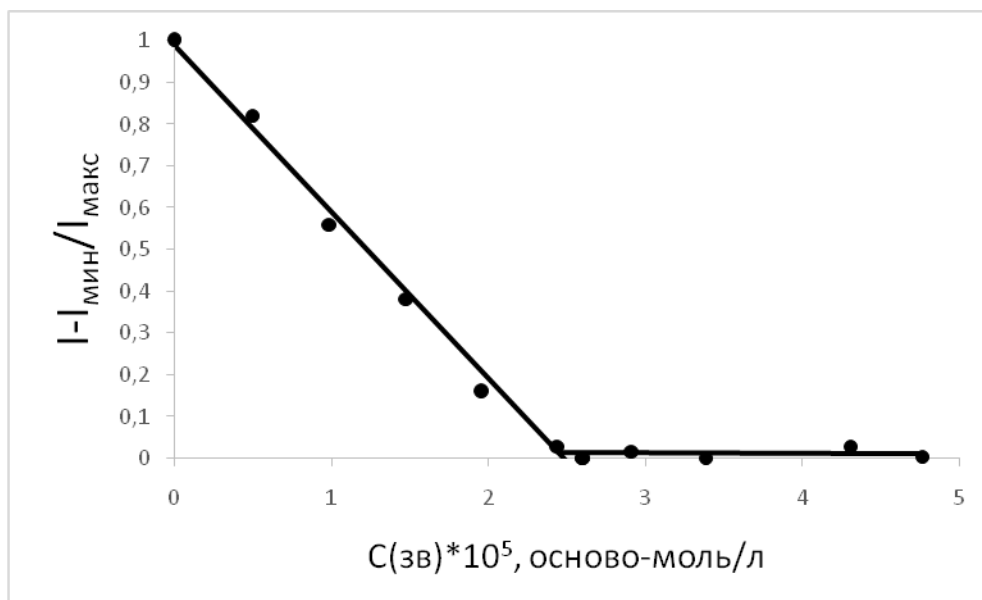


Рис. 9 Зависимость относительной интенсивности флуоресценции суспензии комплекса твердых липосом и «звезд» от концентрации «звезд»; $C_{\text{лип}} = 0.48$ мг/мл; $v_{(\text{ПОФС})} = 0.1$; ТРИС рН = 7; $T = 25^\circ\text{C}$.

Для исследования устойчивости полученного таким образом комплекса в солевом растворе добавляли хлорид натрия. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации соли приведены на рис. 10. Видно, что комплекс «звезд» и липосом полностью диссоциирует в солевом растворе при достижении концентрации соли 0.26 М, так как наблюдается возгорание флуоресценции до начального значения.

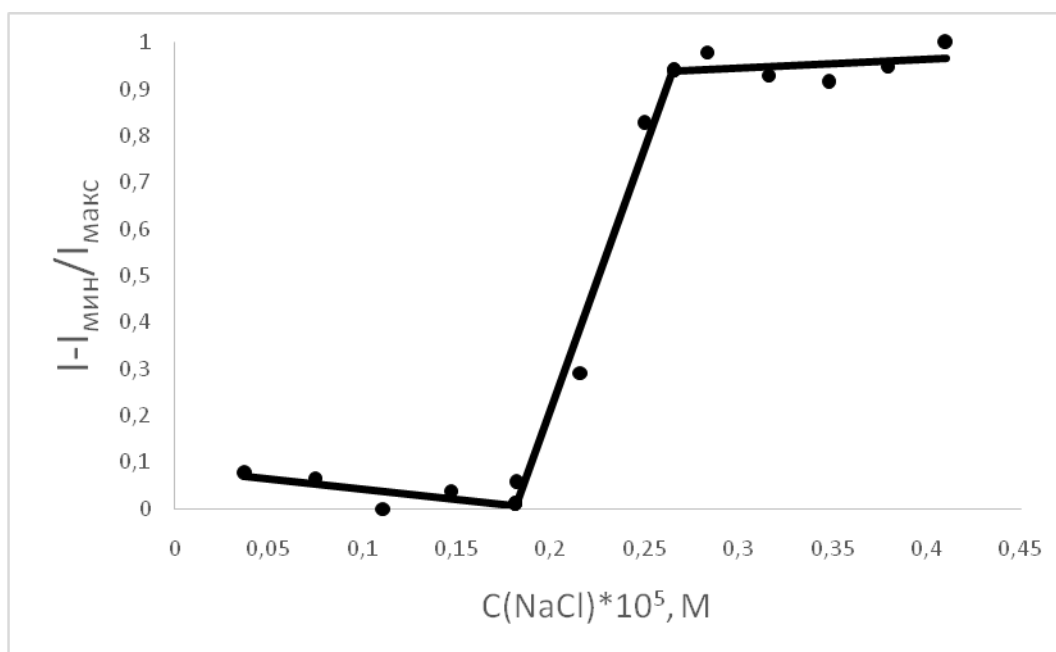


Рис. 10 Зависимость относительной интенсивности флуоресценции суспензий комплексов твердых липосом и «звезд» от концентрации добавленной соли; $C_{\text{лип}} = 0.43$ мг/мл; $[N^+] = 4.76 \times 10^{-5}$ М; ТРИС рН = 7; $T = 25^\circ\text{C}$.

На основании полученных данных, комплексы «твердые» липосомы-звезда оказываются стабильными к диссоциации на исходные компоненты при ионной силе физиологического раствора. При этом устойчивость комплексов не зависит от фазового состояния липосом.

5. Выводы

1. Поликатионные звездообразные полимеры образуют комплексы с жидкокристаллическими (ПОФС/ДОФХ) и «твердыми» (ПОФС/ДПФХ) липосомами с содержанием анионного липида $\nu(\text{ПОФС})=0.1$, что подтверждено динамическим светорассеянием.
2. Продемонстрировано, что стабильность комплексов поликатионных звездообразных полимеров и анионных липосом к диссоциации на исходные компоненты одинакова. Оба вида комплексов стабильны к диссоциации при ионной силе физиологического раствора.
3. Выявлено влияние флип-флопа на количество связываний липосом со «звездой»: на одной звезде в среднем адсорбируется 7 «жидких» липосом и 8 «твердых».

6. Список литературы

1. Л.И. Барсуков. Липосомы // Соросовский обр. журнал, 1998, №10, с 2-9
2. Р. Геннис. Биологические мембраны: структура и функции // Мир, 1997
3. Л.Б. Морголис, Л.Д. Бергельсон. Липосомы и их взаимодействие с клетками М.: Наука, 1986
4. Ю.А. Овчинников. Биоорганическая химия. М.: Рипол Классик, 1987
5. A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran. Liposome: classification, preparation, and applications // *Nanoscale Research Letters*, 2013, №8, p. 102
6. А.С. Дудниченко. Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике. Х.: РА-Каравелла, 2001, с. 143
7. Р. Марри, Д. Греннер. Биохимия человека. М.: Мир, 1993
8. Riaz M. Liposome preparation method // *Pak J Pharm Sci.*, 1996, № 9, p. 65–77
9. Sipai B., Vandana Y., Mamatha. Y, Prasanth V. Liposomes: an overview // *J Pharm Sci Innov.*, 2012, №1, p. 13-21
10. Pick, V. Liposomes with a large trapping capability prepared by freezing // *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1981, p. 186-194
11. Т.В. Таран. Биотехнология получения лекарственных и иммуногенных липосомальных композиций. Автореф. ... докт. мед. наук : 03.00.23;03.00.07. - Ставрополь : 2004. 43 с.
12. О.О. Фаворова - Лечение генами – фантастика или реальность? // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 2. с. 21-27
13. А.А. Ефимова, А.В. Сыбачин, С.Н. Чвалун. Биodeградируемые мультилипосомальные контейнеры // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*, 2015, том 57, № 2, с. 1–5
14. А.А. Yaroslavov, A.V. Sybachin, O.V. Zaborova. Multi-liposomal containers // *Journal Adv Colloid Interface Sci.*, 2015, p. 2-11
15. А.А. Yaroslavov, A.V. Sybachin, O.V. Zaborova. Electrostatically Driven Complexation of Liposomes with a Star-Shaped Polyelectrolyte to Low-Toxicity Multi-Liposomal Assemblies // *Macromol. Biosci.*, 2014, №14, p. 491–495.
16. Lu L., Helgeson R., Jones R. M., McBranch D., Whitten D. Superquenching in cyanine pedant poly(L-lysine) dyes: dependence on molecular weight, solvent and aggregation // *J Am Chem Soc* 2002. V. 124. P. 493-488.