

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет

На правах рукописи

ЗАБОРОВА Ольга Владимировна

**КОМПЛЕКСЫ КАТИОННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР С
ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫМИ ЛИПОСОМАМИ:
ФОРМИРОВАНИЕ, СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА**

02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
проф., д.х.н., в.н.с. Ярославов А.А.

Москва-2014

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
2.1. Модельные липидные мембраны	6
2.1.1. Липиды.....	7
2.1.2. Организация водно-липидных смесей	8
2.1.2.1. Надмолекулярные липидные структуры	9
2.1.2.2. Условия образования липидного бислоя.....	9
2.1.3. Липосомы	12
2.1.4. Упаковка ацильных хвостов в липидном бислое	13
2.1.4.1. Кристаллические фазы L_{β} , L_c и их основные характеристики	14
2.1.4.2. Жидкая фаза L_{α} : основные характеристики	15
2.1.4.3. Ребристая фаза, основные отличия.	15
2.1.5. Фазовые переходы в липидном бислое и факторы, влияющие на температуру фазового перехода.....	16
2.1.5.1. Влияние природы полярной головки липида	16
2.1.5.2. Влияние природы ацильного радикала	17
2.1.6. Стабильность липосом	18
2.1.6.1. Химическая стабильность.....	18
2.1.6.2. Физическая стабильность	19
2.1.7. Подвижность липидных молекул	20
2.1.7.1. Латеральная диффузия	21
2.1.7.2. Трансмембранная миграция (флип-флоп).....	21
2.2. Применение липосом.....	22
2.2.1. Способы доставки лекарственных веществ.....	23
2.2.1.1. Пассивная доставка	23
2.2.1.2. Активная доставка	25
2.2.2. Недостатки липосомальных контейнеров.....	26
2.3. Комплексы полиэлектролитов с противоположно заряженными липосомами.....	27
2.3.1. Взаимодействия между полимером и липосомами	28
2.3.1.1. Электростатические взаимодействия	28
2.3.1.2. Гидрофобные взаимодействия	28

2.3.1.3. Образование водородных связей.....	29
2.3.2. Структурные прерстройки в липидном бислое, вызываемые адсорбцией поликатиона.....	29
2.3.3. Обратимость взаимодействия поликатионов с отрицательно заряженными липосомами.	30
2.3.4. Механизмы агрегации липосом под действием адсорбированного полиэлектролита.....	31
2.3.5. Стабилизация липосом от агрегации под действием поликатиона	32
2.3.6. Влияние адсорбции полиэлектролитов на липосомы на скорость транс-мембранного транспорта низкомолекулярных веществ	32
2.3.7. Взаимодействие комплексов анионные липосомы-поликатион с клетками	33
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	35
3.1. Используемые реагенты.	35
3.1.1. Фосфолипиды и ПАВ.	35
3.1.2. Полимеры.	35
3.1.3. Низкомолекулярные реактивы.	35
3.1.4. Вода.....	36
3.1.5. Структурные формулы используемых веществ.....	36
3.2. Объекты исследования.	38
3.2.1. Получение липосом.	38
3.2.2. Получение флуоресцентно меченных липосом, липосом, содержащих ДИЛ и липосом, наполненных солью и лакмусом.....	38
3.2.3. Получение полипептидных везикул.....	39
3.3. Методы исследования.....	39
3.3.1. Динамическое светорассеяние.....	39
3.3.2. Электрофоретическая подвижность	40
3.3.3. Флуориметрия	40
3.3.4. Спектроскопия	40
3.3.5. Кондуктометрия.....	40
3.3.6. Препаративное центрифугирование.....	40
3.3.7. Потенциометрия	41

3.3.8. Криогенная трансмиссионная электронная микроскопия.....	41
3.3.9. Дифференциальная сканирующая калориметрия	41
3.3.10. Прижизненное окрашивание клеток метилтетразолевым синим.....	42
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	42
4.1. Комплексы поликатионных щёток с анионными липосомами	42
4.1.1. Комплексы с участием $KL^{2-}/\Phi X$ липосом	42
4.1.2. Комплексы с участием $\Phi C^{1-}/\Phi X$ липосом.....	51
4.2. Структурные перестройки в мембранах липосом, адсорбированных на поверхности поликатионных щёток.....	59
4.3. Комплексы, содержащие липосомы с различными наполнителями.	65
4.4. Комплексы поликатионных щеток с pH-чувствительными липосомами.	68
4.5. Определение цитотоксичности комплексов поликатионных щёток с анионными липосомами.	74
4.6. Комплексы анионных липосом с полипептидными везикулами.	75
5. ВЫВОДЫ.....	84
6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	85
7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	87

1. ВВЕДЕНИЕ

Сферические бислойные липидные везикулы (липосомы) широко используются в качестве контейнеров для инкапсулирования и контролируемого высвобождения биологически активных веществ. Уникальность устройства липосом позволяет инкапсулировать в них гидрофобные и гидрофильные соединения, встраивая первые в гидрофобную часть липосомальной мембраны и растворяя вторые во внутренней водной полости липосом. Несмотря на значительный прогресс в области создания липосомальных контейнеров, лишь немногие лекарственные препараты были реализованы на практике. Основные причины неудач – ограниченная емкость липосомального контейнера, низкая эффективность захвата липосом целевыми клетками и медленное высвобождение лекарства в зоне терапевтического действия.

Различными научными группами ранее предпринимались попытки иммобилизовать липосомы на поверхности твердых носителей (имплантов) с целью значительного локального концентрирования контейнеров и повышения тем самым эффективности терапевтического действия липосомальных лекарств. Однако закрепление липосом на твердом носителе (стеклянной пластинке, полимерном волокне, коллоидной частице и проч.) обычно сопровождается их разрушением и неконтролируемым выходом лекарства. Описанные в литературе немногочисленные удачные примеры иммобилизации нативных (неразрушенных) липосом предполагают проведение достаточно сложных процедур предварительной модификации как липосом, так и поверхности. Это заставляет обратиться к поиску новых подходов к иммобилизации липосом, которые лишены указанных выше недостатков.

В данной работе исследованы закономерности формирования и свойства мультилипосомальных конструкций, иммобилизованных на частицах с привитыми поликатионными цепями. Продемонстрированы возможности получения полимер-коллоидных комплексов, несущих заданное число липосом, заполненных различным содержимым в заданном соотношении, а также управляемого испускания инкапсулированного вещества.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Системы для доставки лекарственных веществ являются многообещающими в фармацевтическом плане по нескольким причинам. Во-первых, за счёт пассивной доставки контейнер с лекарственным средством накапливается в определённых областях: опухолях, местах инфекций и воспаления. Во-вторых, такая технология позволяет улучшить терапевтический индекс уже существующих лекарственных препаратов. В-третьих, на данный момент очень интенсивно благодаря успехам биотехнологии развивается область получения новых лекарственных препаратов на основе белков, пептидов, олигонуклеотидов и плазмидов. Клинические разработки лекарств такого типа невозможны без применения носителей.

Несмотря на то, что наномедицина является достаточно новой ветвью науки, большое количество различных типов наноконтейнеров для доставки лекарственных веществ было разработано за последние 30 лет. Используемые в настоящее время фармацевтические контейнеры, такие как липосомы, мицеллы, наноэмульсии, полимерные наночастицы, дендримеры, вирусы и вирусоподобные частицы, полиэлектролитные комплексы и множество других, демонстрируют широкое разнообразие полезных свойств: долговременная циркуляция в кровотоке, приводящая к их накоплению в патологических областях; специфическая доставка, возможная благодаря различным лигандам на поверхности частиц; повышенная способность к проникновению в клетку; способность к высвобождению содержимого под действием определённых физиологических условий.

Далее более подробно будут рассмотрены липосомальные наноконтейнеры и способы их модификации полимерами, позволяющие улучшить их физико-химические характеристики.

2.1. Модельные липидные мембраны

Липосомы – сферические липидные бислойные структуры. Размер липосом лежит в области от 20 нм до нескольких микрометров. Липосомы могут быть сформированы одной или несколькими концентрическими мембранами, каждая толщиной около 4 нм. Липосомы обладают уникальными свойствами благодаря амфифильной природе

составляющих их липидов, что обеспечивает возможность их использования в биомедицинских целях. Схематическое строение липосом показано на Рис. 1.

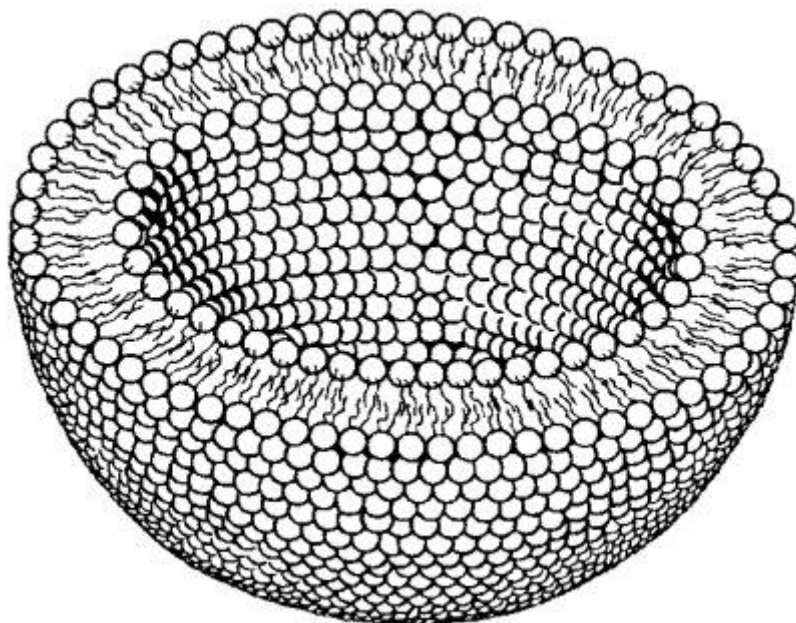


Рис. 1. Схематическое изображение липосомы

Для того чтобы понять свойства и поведение липосом следует рассмотреть главные свойства амфифильных липидов и их поведение в водных растворах.

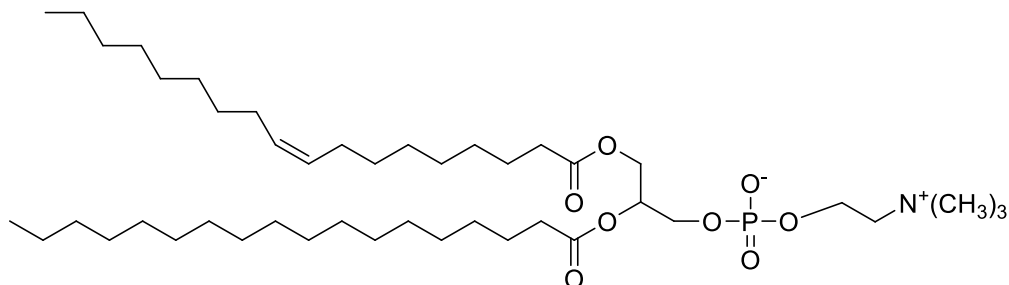
2.1.1. Липиды

Липидами называют жирные кислоты и их фосфо- и азотсодержащие производные [1]. Огромное разнообразие их подклассов обусловлено большим количеством функций, выполняемых липидами в биологических объектах.

Характерной чертой всех мембранных липидов, за исключением триглицеридов, является их амфифильная природа – наличие полярной головки из гидрофильных групп молекулы и гидрофобных радикалов. Наиболее многочисленны по разнообразию глицерофосфолипиды, называемые также фосфолипидами [2]. Каркасом молекул фосфолипидов служит глицерин по одной из гидроксильных групп этерифицированный остатком фосфорной кислоты, по двум другим жирными кислотами. Кроме фосфатной группы полярная головка липида обычно включает остаток спирта или сахара. Именно этот остаток обуславливает важнейшие физико-химические свойства молекулы липида – форму молекулы и ее заряд при физиологических условиях.

Фосфатидилхолин относится к классу глицерофосфолипидов и является наиболее распространённым липидом плазматической мембраны клеток эукариот. Его

содержание в плазматической мембране эукариотических клеток колеблется в пределах от 30 до 45%. [1]. Смесь природных фосфатидилхолинов с различной длиной и степенью насыщенности хвостов называется лецитин. Структурная формула 2-пальмитоил-3-олеоил-фосфатидилхолина, являющегося основным компонентом лецитина, приведена ниже.



2.1.2. Организация водно-липидных смесей

Амфифильная природа – наличие полярной головки из гидрофильных групп молекулы и гидрофобных углеводородных хвостов – позволяет липидам образовывать в водных растворах стабильные агрегаты. С точки зрения термодинамики, основной силой, стабилизирующей липидные агрегаты, являются гидрофобные взаимодействия, которые имеют энтропийную природу и связаны с ограничениями, налагаемыми на упаковку молекул воды вокруг неполярных углеводородов. К другим, менее значимым стабилизирующим факторам, относятся: вандерваальсовы взаимодействия между соседними гидрофобными цепями и водородные связи, которые образуются между полярными головками некоторых липидов (например, между молекулами фосфатидилэтаноламина). В результате агрегации система принимает форму, при которой молекулы воды контактируют с полярными головками липида, а гидрофобные хвосты обращены друг к другу. Форма агрегатов, образуемых молекулами фосфолипидов: мицеллы, коаксиальные цилиндрические с гексагональной симметрией или бислойные (ламеллярные) структуры, – зависит от геометрических параметров молекулы липида. Устойчивые бислои могут образовывать липиды, молекулы которых можно представить в форме цилиндра (например, глицерофосфолипиды с двумя алкильными цепями) [1, гл 2]. В случае плоских бислоев наличие контактов с полярным растворителем крайних гидрофобных участков энергетически невыгодно, поэтому

система самопроизвольно замыкается, образуя сферические везикулы – липосомы, которые широко используются в качестве моделей липидных мембран.

2.1.2.1. *Надмолекулярные липидные структуры*

Липиды обладают амфифильной природой, поэтому, попадая в водный раствор, они стремятся образовать такие надмолекулярные структуры, в которых взаимодействие гидрофобных хвостов с водной средой было бы минимальным, а взаимодействие гидрофильных «головок» с полярным растворителем — максимальным. По этой причине энергетически выгодными являются агрегаты, в которых гидрофобные участки замыкаются на себя, а гидрофильные повернуты в растворитель, образуя «шит» на поверхности гидрофобной фазы. В случае неполярных органических растворителей образуются обращенные везикулы. Можно выделить два типа таких структур: мицеллы и везикулы. То, какая форма будет реализована в растворе, зависит от природы липидов и термодинамических параметров. Методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [3;4] было показано, что молекулы воды ориентируются вокруг полярных головок липида, образуя плотно связанную гидратную оболочку. При этом на каждую заряженную или гидрофильную группу приходится от 3 до 20 молекул воды.

2.1.2.2. *Условия образования липидного бислоя*

Способность молекул образовывать агрегаты определенного строения зависит от стандартного химического потенциала, который зависит от 1) силы поверхностного притяжения на границе раздела фаз вода-липид, 2) силы отталкивания между головками липидов и 3) свободной энергии, зависящей от длины углеводородного фрагмента молекулы и определяющей критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ).

Влияние геометрических факторов

Эффективная форма липидной молекулы определяет структуру мембраны, которую образуют такие молекулы. Изменение рН и концентрации противоиона вносят вклад в упаковку липидов за счет изменения гидратной оболочки полярной головки и силы водородных связей между соседними головками.

Эффективная молекулярная форма описывается параметром упаковки P :

$$P = v / (a^2),$$

где v — молекулярный объем углеводородной области амфифильной молекулы, a — оптимальная площадь поверхности, занимаемая молекулой на гидрофобной

поверхности раздела, l — максимальная длина алкильной цепи. Вклад эффективной формы молекулы как функция от параметра упаковки P представлен на Рис. 2 [5].

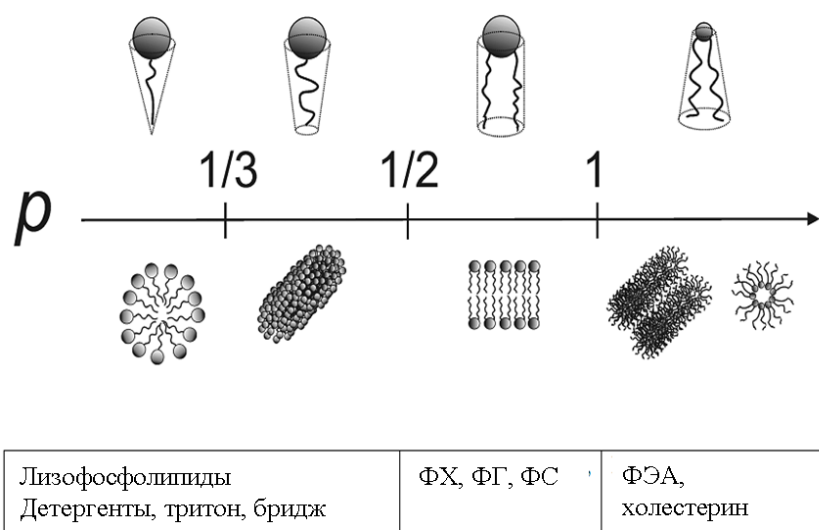


Рис. 2. Геометрия липидов и параметр их упаковки [6].

Таким образом, условие образования бислоя сводится к тому, что P должен лежать в интервале от $1/2$ до 1.

Влияние термодинамических факторов

Необходимо учитывать не только геометрические характеристики молекул, но и их термодинамические параметры. Для этого, был введен определенный критерий, описывающий процессы, происходящие при растворении амфифильных молекул в полярных растворителях. Этот критерий — стандартная свободная энергия переноса вещества между полярной и неполярной фазой ($\Delta G_{переноса}$), определяется по отношению концентраций вещества в водной и органической фазах:

$$\frac{[X]_{H_2O}}{[X]_{HC}} = K, \text{ при этом}$$

$$-RT \ln K = \Delta G_{переноса} = (\mu_{HC}^o - \mu_{H_2O}^o).$$

В свою очередь, $\Delta G_{переноса}$, а значит, и химический потенциал, отвечают за возможность образования надмолекулярных структур. В результате выделяют параметр

— критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ), благодаря которому можно указать условия образования липидных агрегатов.

Водный раствор может состоять из смеси различных форм, включая мономеры и ассоциаты. Важно отметить, что химический потенциал для равновесного состояния одинаков для всех форм:

$$\mu_N = \mu_N^o + kT \ln(X_N / N) / N = const.$$

для всех N , где μ_N — стандартный химический потенциал агрегатов, содержащих N молекул, X_N — мольная доля амфифильных молекул в агрегатах, содержащих N молекул, k — константа Больцмана, T — температура.

Для упрощенной монодисперсной системы имеем:

$$X_1 = X_M (= X_{KKM}),$$

тогда химический потенциал не будет зависеть от количества молекул в агрегате.

$$\mu_1^o = \mu_M,$$

$$\mu_1^o + kT \ln(X_{KKM}) = \mu_M^o + kT \ln(X_{KKM} / M) / M,$$

$$\Delta G_{миц}^o = (\mu_M^o - \mu_1^o) = kT \ln(X_{KKM}),$$

где $\Delta G_{миц}^o$ — свободная энергия гидрофобного переноса за счет вытеснения воды из неполярных областей амфифильных агрегатов при формировании ассоциата, содержащего локальные органическую фазу. Стоит отметить, что при малых значениях ККМ свободная энергия уменьшается, т.е. высоко гидрофобные молекулы стараются агрегировать при меньших концентрациях.

Таким образом, для образования бислоя необходимо, чтобы липид можно было представить в виде цилиндра, у которого площадь полярной головы почти совпадает с площадью углеводородных хвостов, при этом вещество должно иметь низкое значение ККМ.

Образование заполненных растворителем сферических липидных везикул, или липосом, происходит самопроизвольно. Прямые контакты краев бислоя с водой энергетически не выгодны, поэтому и происходит замыкание бислоя в сферы, что устраняет этот краевой эффект. Движущей силой процесса является увеличение энтропии в результате образования из одного плоского бислоя нескольких везикул [7;8].

2.1.3. Липосомы

Липосомы представляют собой коллоидные образования, состоящие из небольшого объёма водной фазы, отделённой от объёма раствора замкнутым липидным бислоем. Многие фосфолипиды при диспергировании в воде самопроизвольно образуют гетерогенную смесь везикулярных структур, состоящих из нескольких бислойных концентрических оболочек. Такие липосомы называются мультиламеллярными везикулами (МЛВ). Большой интерес представляют моноламеллярные везикулы, т.е. везикулы, образованные одинарным бислоем. При получении липосом возможно контролировать их внутреннее содержимое, состав бислоя и его кривизну (размер липосом).

Обычно липосомы разделяют на малые ($d \sim 200 \div 500 \text{ \AA}$), большие ($d \sim 500 \div 5000 \text{ \AA}$) и гигантские (до 300 мкм). Из них наибольший для исследователя интерес представляют малые моноламеллярные везикулы (ММВ).

Малые моноламеллярные везикулы можно получать несколькими способами: ультразвуковая обработка водных дисперсий фосфолипидов, быстрое введение этанольного раствора липида в водную фазу, а также метод экструзии.

Наиболее широко используемым методом получения ММВ является ультразвуковая обработка водных суспензий мультиламеллярных липидных везикул. Так как во время процесса везикулы полностью разрушаются и образуются заново, начальный размер и ламеллярность везикул не имеют значения. Существует два метода ультразвуковой обработки: а) с использованием щупа, б) обработка в ультразвуковой бане. Первый метод применяется для суспензий с высокой концентрацией липида или для получения систем с высокой вязкостью. Вторым методом применим для получения больших объёмов разбавленного липида.

Озвучивание при помощи щупа. Для наиболее эффективного проведения процесса, целесообразно проводить озвучивание в круглодонной пробирке с диаметром лишь немного превосходящем диаметр щупа. Щуп должен быть погружён в суспензию липида не более чем на 4 мм и не должен касаться стенок пробирки. Из-за выделения тепла во время озвучивания пробы, существует риск окисления липида. Чтобы избежать этого, дисперсию липида следует охлаждать во время процесса озвучивания.

Озвучивание в бане. Этот метод получения ММВ более мягкий, чем озвучивание пробы при помощи щупа, и риск окисления липида в этом методе невелик. Объём пробы

при озвучивании в бане намного больше, а температурный контроль необязателен. При использовании этого метода невозможно получить липосомы минимального размера. Даже после длительной процедуры озвучивания, полученная суспензия не будет гомогенна по размерам липосом. Поэтому для опытов, где распределение липосом по размерам играет большую роль, получение ММВ этим способом неприменимо.

Экструзию липосом чаще всего проводят при помощи пресса Френча. При этом образуется гомогенная смесь моно- и олиголамеллярных везикул со средним размером около 30-80 нм (в зависимости от используемого давления). Данный метод используется для получения липосом, с включёнными в них чувствительными к физико-химическим воздействиям молекулами (ферментами). Процесс экструзии следует проводить при температуре выше, чем температура фазового перехода мембранного липида, в то же время систему следует охлаждать, чтобы избежать окисления липидов или уменьшения активности биологических молекул, входящих в состав мембраны. Размер получающихся везикул зависит от липидного состава, температуры, и, что наиболее важно, от используемого давления. Липосомы, полученные таким способом, хоть и являются ММВ, но всё же больше, чем везикулы, полученные при помощи ультразвукового озвучивания, однако, такие липосомы более стабильны. [9]

2.1.4. Упаковка ацильных хвостов в липидном бислое

Для липидных систем характерен полиморфизм фазовых состояний. В зависимости от условий (липидный состав, температура, ионная сила, pH) в них возможно существование разных фаз.

Для бислойных мембран, состоящих из диацилфосфолипидов, можно выделить четыре фазы: три кристаллические фазы L_{β} , L_c , P_{β} и одну жидкую фазу L_{α} (Рис. 3).

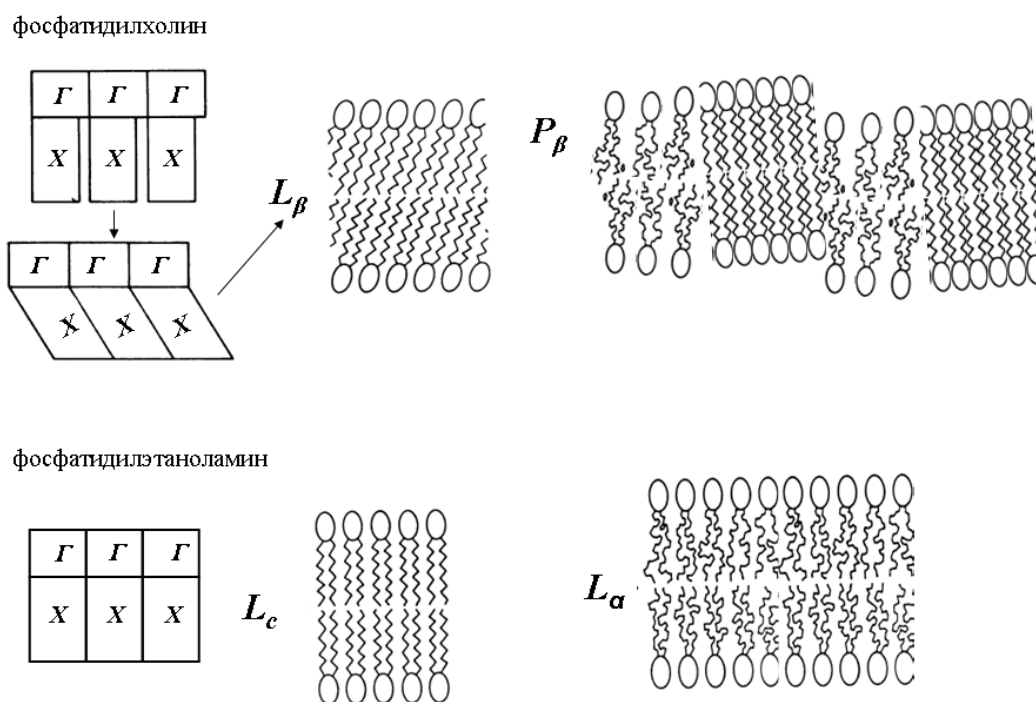


Рис. 3. Схематичное представление упаковки липидных молекул в липидном бислое для разных фазовых состояний.

2.1.4.1. Кристаллические фазы L_β , L_c и их основные характеристики

L_β – гелевая фаза, в которой углеводородные цепи расположенные параллельно друг другу под углом $30-32^\circ$ к нормали бислоя, образуют гексагональную решетку [5]. Цепи из внутреннего монослоя параллельны цепям из внешнего монослоя.

Основная причина отклонения от нормали липидных молекул по обе стороны бислоя заключается в поведении гидрофобных хвостов. В пользу этого говорят результаты работы [10], в которой было показано, что существующие взаимодействия между соседними молекулами липидов, обусловленные образованием диполь-дипольных контактов, солевых и/или водородных связей между головами, не изменяют площадь головы (Γ) с увеличением температуры (коэффициент термического расширения ($\alpha A \approx 0.0003/^\circ\text{C}$)). Голова липида имеет постоянную площадь A , больше удвоенной площади углеводородных цепей A_c , что реализуется при температурах ниже фазового перехода. Для компенсации различий в площадях составных частей молекул липидов фосфатидилхолинового ряда происходит наклон цепей на угол $\cos\theta = 2A_c/A$ [11] (см. Рис. 3).

В отличие от L_β , L_c – характеризуется также упорядоченным расположением липидных молекул, с той лишь разницей, что молекулы расположены перпендикулярно нормали. Формирование такой фазы характерно для липидов фосфатидилэтаноламинового ряда [12]. Фосфоэтаноламин не содержит трех метильных групп, площадь головы практически совпадает с площадью хвостов, и поэтому формируется фаза, в которой соседние молекулы не наклонены.

Плотная упаковка липидов в состоянии L_β и L_c приводит к тому, что коэффициент латеральной диффузии липидных молекул составляет величину порядка 10^{-3} мкм²/с, т.е. движение липидов относительно заторможено и составляет всего 0,1 нм/с [13].

2.1.4.2. Жидкая фаза L_a : основные характеристики

L_a – молекулы липидов расположены перпендикулярно к плоскости бислоя, полярные головки остаются связанными между собой. За счет теплового движения углеводородных хвостов происходит взаимное отталкивание липидных молекул, что приводит к увеличению их общей площади. Так для дипальмитоилфосфатидил холина (ДПФХ) изменение температуры от 23°C (L_β) до 50°C (L_a) приводит к увеличению суммарной площади молекулы от 70 до 77 Å². [14]

В тоже время, для ненасыщенных липидов взаимное отталкивание ацильных хвостов наблюдается в результате суперпозиции теплового движения и перехода из цис- к транс- конформеру ацильных хвостов. Для того же температурного диапазона, что и для ДПФХ, увеличение суммарной площади молекулы диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) составляет 17 Å²: с 68 в (L_β) до 85 Å² (L_a) [15].

Коэффициент латеральной диффузии молекул в бислое составляет 1 мкм²/с, что соответствует скорости перемещения липидов 100 нм/сек [16].

2.1.4.3. Ребристая фаза, основные отличия.

Большинство насыщенных фосфатидилхолиновых липидов имеют возможность переходить в промежуточную фазу, при температурах немного ниже температуры основного перехода, с образованием ребристой фазы. P_β – фаза характеризуется также перпендикулярным расположением липидов к поверхности бислоя, что и L_β , но под углом ~30° к локальной нормали (Рис. 3). Хотя причина образования ребер до конца не изучена, тем не менее предпринятые попытки исследования рентгеновским рассеянием, молекулярной динамикой и ЯМР указывают на то, что присутствует два типа

ориентации липидных хвостов – один полностью упорядоченный, сопоставимый по структуре с гелем, другой – полностью разупорядоченный как в жидкой фазе [17;18;19].

2.1.5. Фазовые переходы в липидном бислое и факторы, влияющие на температуру фазового перехода

Основной фазовый переход связан с переходом углеводородных цепей липидных молекул из состояния геля (L_{β}) в состояние жидкого кристалла (L_{α}) [20;21;22]. В геле-состоянии все гидрофобные хвосты фосфолипидных молекул вытянуты строго параллельно друг другу (полностью находятся в транс-конформации), подвижность липидных молекул сильно ограничена. В жидкокристаллическом состоянии возможна относительно высокая молекулярная подвижность компонентов: гидрофобные углеводородные остатки изгибаются, нарушается их параллельность, и мембрана в целом ведет себя как жидкая, текучая фаза.

Температура основного фазового перехода (T_m) зависит от многих факторов, в том числе от природы полярных головок, длины и степени ненасыщенности углеводородного радикала, силы взаимодействия между цепями, наличия холестерина в бислое [23;24;25].

2.1.5.1. Влияние природы полярной головки липида

Со стороны гидрофильных голов может проявляться стерическое отталкивание соседних молекул в бислое. Влияние взаимодействий между полярными головками липидов представлено на Рис. 4. При одинаковой длине ацильных хвостов температура плавления производных фосфотидилсерина на 15 °С выше по сравнению с фосфатидилхолинами в силу наличия отталкивания между группами триметиламинов. С другой стороны, приведенные данные для фосфатидилглицеролов (ФГ) полностью совпадают с липидами ФХ ряда. Принимая во внимание, что в голове ФГ присутствуют одновременно и отрицательный заряд от фосфатной группы, и пришитый к голове через сложно эфирную связь остаток этиленгликоля, можно говорить, что при прочих равных условиях влияние стерических затруднений оказывает более выраженное воздействие на упаковку липидов в мембране по сравнению с зарядом. Следовательно, это приводит к снижению температуры плавления [26].

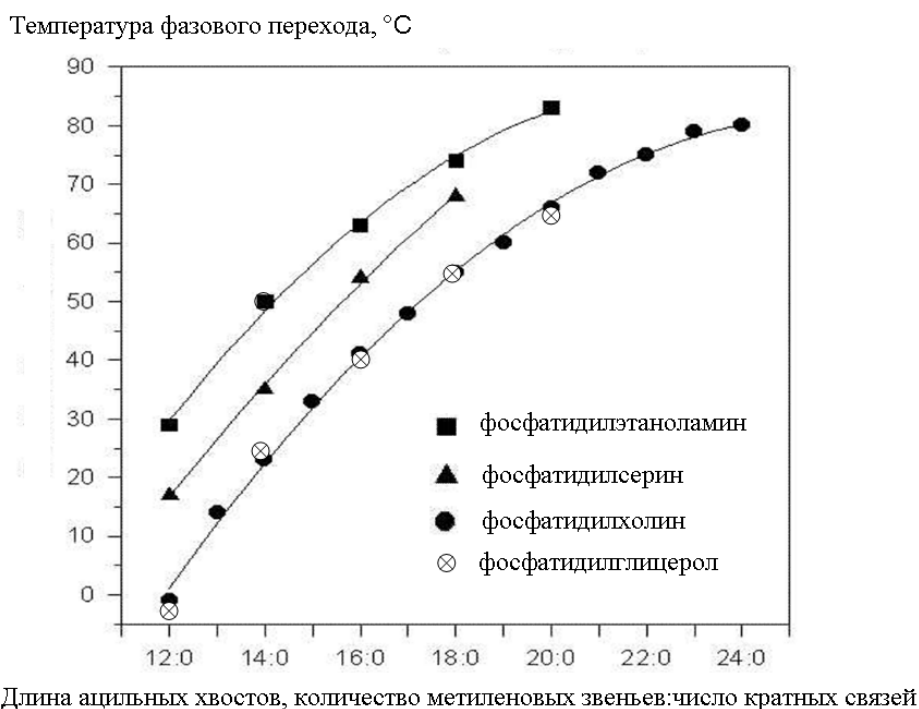


Рис. 4. Температура основного фазового перехода для липидов различного строения [5].

Образование водородных связей между головами липидов приводит к дополнительному структурированию – фосфотидилэтаноламиновые производные показывают самую высокую температуру основного перехода в силу образования водородных связей между головами липида.

2.1.5.2. Влияние природы ацильного радикала

Со стороны ацильных хвостов существенное влияние на плавление углеводородных цепей оказывает наличие и положение в них ненасыщенных связей. В зависимости от расположения двойной связи T_m может варьироваться в диапазоне от 40°C до -20°C, что было продемонстрировано на *sn-1*-октадецил-ненасыщенной связи. Расположение двойной связи в атомах C₂-C₈ приводит к линейному уменьшению температуры плавления с 40 до -20°C. Как было отмечено выше переход из *цис*- в *транс*- конформер приводит к увеличению площади молекулы липида. Если изменение происходит в области, близкой к полярным головам, то конформационный переход сопровождается снижением упорядоченности в верхних структурированных частях ацильных хвостов, что драматически отражается на температуре плавления всего бислоя. Однако при расположении двойной связи на концах ацильных цепей,

кооперативность повышается и при приближении к центру бислоя влияние кратной связи пропадает (Рис. 5).

И наконец, количество хвостов, связанных с полярной головой может приводить к увеличению плотности упаковки липидов, что продемонстрировано в работе [27] на примере фосфатидной кислоты. Наличие только одного ацильного хвоста приводит к увеличению температуры плавления на 25°C относительно ФХ-липидов.

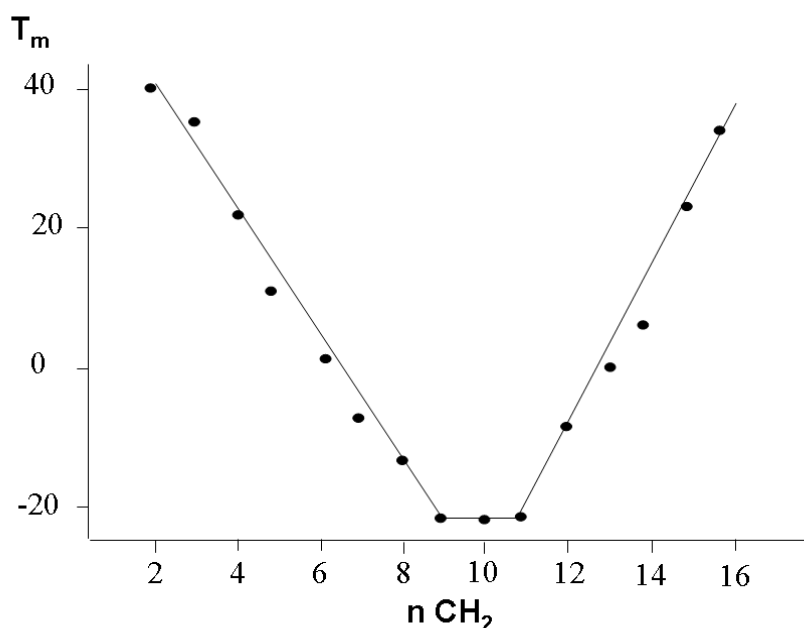


Рис. 5. Температура основного фазового перехода как функция положения двойной связи в липиде диоктадеканойл-ФЭА [28]

Для чистых липидов температурный интервал фазового перехода обычно невелик, что указывает на кооперативный характер процесса. Изменение внешних условий может также вызывать изменения геометрической организации бислоя (мезофазные переходы) и образование небислойных структур (в основном, гексагональной фазы) [29;30]. В биологических мембранах липидный бислой наиболее близок по своим свойствам к ламеллярной жидкокристаллической фазе [1, гл. 2].

2.1.6. Стабильность липосом

2.1.6.1. Химическая стабильность

Липосомальная мембрана в основном состоит из фосфолипидов, подверженных гидролизу по сложноэфирной связи [31]. Следствием гидролиза фосфолипидов является

реорганизация липидов из ламеллярной системы в мицеллярную [32]. При этом образуются лизофосфатидилхолин и жирные кислоты [33], что приводит к увеличению проницаемости мембраны [34]. Другой путь деградации фосфолипидов – пероксидация ненасыщенных ацильных цепей [34]. Пероксидация липидов также приводит к увеличению проницаемости бислоя.

2.1.6.2. *Физическая стабильность*

Дисперсия липосом термодинамически не стабильна [35]. Общая свободная энергия системы может быть снижена уменьшением площади поверхности. Липосомы обладают тенденцией к агрегированию под действием ван-дер-Ваальсовых сил. Присутствием других взаимодействий между частицами определяется стабильность системы. Применение липосом в качестве наноразмерных контейнеров для лекарственных веществ [36;37], вакцин [38], ферментов или генетического материала [39] предполагает стабильность системы.

В 40-х годах прошлого века Дерягин, Ландау [40] и Вервей, Овербек [41] независимо друг от друга разработали теорию коллоидной стабильности, или теорию ДЛВО. Она стала основной теорией, количественно описывающей стабильность большинства коллоидных систем. Согласно этой теории стабильность системы обуславливается воздействием на коллоидные частицы в полярных растворах двух независимых сил: ван-дер-Ваальсову силу притяжения и отталкивающую электростатическую силу.

Теория ДЛВО применима для описания стабильности коллоидных систем, состоящих из поверхностно активных веществ (ПАВ) [42;43;44], амфифильных лекарств [45;46], латексов [47;48], белковых комплексов [49;50], а также липосом [51;52;53]. Несмотря на общий успех использования теории ДЛВО в приложении к стабильности липосом присущи некоторые ограничения [54].

Водная суспензия липосом является коллоидной системой, следовательно взаимодействие между везикулами может приводить к образованию либо стабильных агрегатов, либо временных ассоциатов за счет протекания процессов, называемых соответственно коагуляцией и флокуляцией. В результате протекания этих процессов суспензия малых моноламеллярных везикул представляет собой смесь нескольких сосуществующих структур: малых индивидуальных везикул, флокулированных везикул, агрегированных везикул и слившихся везикул. Поскольку малые липосомы

термодинамически неустойчивы, «чистая» популяция малых моноламеллярных везикул существует только в разбавленных свежеприготовленных суспензиях. Расстояние между флокулированными везикулами составляет 50-100 Å, расстояние же между поверхностями двух липосом в агрегатах составляет около 5 Å. При столь малом расстоянии (в агрегатах) возникает сильное межвезикулярное взаимодействие. Когда соприкасающиеся участки сильно искривлены, это взаимодействие может приводить к образованию энергетически более выгодных структур с большим радиусом кривизны, т.е. к слиянию везикул. Известно, что к веществам, вызывающим агрегацию и (или) слияние липосом, относятся белки [55], полисахариды, катионы двух- и трехвалентных металлов [56], синтетические водорастворимые полимеры, такие как полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, различные поверхностноактивные вещества (ПАВ) и др., с успехом использованные также для агрегации и слияния животных и растительных клеток [57;58;59;60].

При температуре выше фазового перехода слияние везикул протекает очень медленно, что обусловлено межвезикулярными силами отталкивания и структурированностью воды в межвезикулярном пространстве. При температурах ниже T_m те же липосомы быстро увеличиваются в размерах. Процесс слияния одноламеллярных везикул, мембрана которых находится в состоянии геля, протекает как бы в две стадии. Первая стадия приводит к образованию везикул со средним диаметром 950 Å. Предполагается, что процесс агрегации продолжается до образования агрегатов, состоящих из 18 индивидуальных везикул, что связано со стремлением системы к образованию наиболее плотной упаковки сферических частиц. Расстояние между мембранами двух агрегированных везикул составляет величину, меньшую 5.2 Å. После достижения этого критического размера происходит слияние с образованием везикул, имеющих диаметр 700 Å

2.1.7. Подвижность липидных молекул

Положение липидных молекул в бислое друг относительно друга может изменяться в результате двух процессов: латеральной диффузии и трансбислойной миграции (флип-флопа). Эти процессы сильно различаются по скорости.

2.1.7.1. Латеральная диффузия

Латеральная диффузия – это тепловое движение липидных молекул в пределах монослоя. Этот процесс изучают, как правило, с помощью внешних зондов – фотореактивных [61;62], спин-меченых [63], или флюоресцентных [64]. Для молекул липидов в жидкокристаллической модельной мембране эффективная константа скорости латеральной диффузии находится в пределах 10^6 - 10^8 с⁻¹ [1]. Таким образом, липидная молекула пробегает сферическую мембрану диаметром 10 мкм за 5 мин. Подвижность липидных молекул в плоскости бислоя зависит от плотности упаковки углеводородных цепей: относительно быстрая диффузия липидов в жидкокристаллическом состоянии замедляется на несколько порядков при переходе бислоя в состояние геля. Кроме того, латеральная подвижность липидов зависит от длины и насыщенности углеводородных цепей [65], и содержания в мембранах холестерина. Скорость латеральной диффузии фосфолипидов с разными полярными головками различается незначительно.

2.1.7.2. Трансмембранная миграция (флип-флоп)

Трансбислойная миграция (флип-флоп) липидов заключается в перемещении молекул липидов из одного монослоя в другой. Это явление было открыто в 1971 году Корнбергом и Макконеллом, которым удалось определить скорость флип-флопа в малых моноламеллярных липосомах методом ЭПР [66]. Константы скорости флип-флопа липидов находятся обычно в пределах 10^{-3} - 10^{-6} с⁻¹. В везикулах смешанного состава скорость зависит от равновесного распределения фосфолипидов между наружной и внутренней поверхностью мембраны. Природа самой липидной молекулы также является фактором, определяющим скорость её трансмембранной миграции. В работе [67] было показано, что скорость трансбислойной миграции фосфолипида зависит от длины углеводородных радикалов ацильных цепей и природы полярной головки, и в основном определяется энергией активации (около 40 ккал/моль) переноса его полярной головки через гидрофобную область бислоя. Это достаточно большая величина, которая показывает, что при увеличении температуры на 10 °С скорость флип-флопа увеличивается почти в 19 раз. Скорость трансбислойной миграции липидных молекул зависит также от фазового состояния бислоя и увеличивается при переходе из гель-фазы в жидкокристаллическое состояние [68].

На основании большого числа экспериментальных данных было выявлено, что транспорт низкомолекулярных заряженных или цвиттер-ионных гидрофильных молекул через липидный бислой обусловлен образованием флуктуационных водных каналов в порах, пронизывающих липидный бислой [69;70]. Также был сделан вывод, что перенос ионов и гидрофильных молекул через бислой осуществляется параллельно с флип-флопом по механизму образования торроидных пор, которые также фигурируют в литературе как «водные провода» или «водные каналы».

Для ускорения транспорта внутреннего содержания липосом необходимо наличие в мембране дефектов, которые возникают на границе раздела доменов при наличии липидов с геометрией обратного конуса, высокой разницы осмотического давления, рН или ионной силы по разные стороны мембраны [71;72;73]. Для снижения скорости вытекания используют липосомы, состоящие из липидов с хорошей взаимной растворимостью. Также добавляют холестерин, снижающий скорость флип-флопа липидов и вероятность образования торроидных пор. Можно использовать уравнивание осмотического давления, ионной силы и рН по разные стороны мембраны.

Применение выше перечисленных способов снижения проницаемости мембран позволило авторам работы [74] создать липосомы, способные удерживать модельные лекарства до 3 месяцев в биологическом окружении.

2.2. Применение липосом

Липосомы представляют собой широко используемую экспериментальную модель, которая позволяет воспроизводить в искусственных условиях многие свойства и характеристики биологических мембран. Липосомы, как и биологические мембраны, представляют собой замкнутые системы, что делает их пригодными для изучения пассивного транспорта ионов и малых молекул через липидный бислой. Состав липидов в липосомах можно произвольно варьировать и таким образом направленно изменять свойства мембраны. В настоящее время хорошо разработаны методы включения функциональноактивных мембранных белков в липосомы. Такие искусственные белково-липидные структуры называются протеолипосомами [75]. Благодаря возможности реконструкции мембраны из её основных компонентов удается моделировать ферментативные, транспортные и рецепторные функции клеточных мембран. В

липосомы можно ввести антигены, а также ковалентно присоединить антитела и использовать их в иммунологических исследованиях. Они представляют собой удобную модель для изучения действия многих лекарственных веществ, витаминов, гормонов, антибиотиков и т.д.

Другой обширной областью применения липосом являются контейнеры для доставки низкомолекулярных веществ. Благодаря уникальной структуре липосомы способны включать в себя как гидрофильные вещества – во внутренний объём, так и гидрофобные – в область жирных хвостов [76;77]. Подобного рода контейнеры могут использоваться для доставки генов (или фрагментов ДНК). Эта способность липосом в совокупности с хорошей биосовместимостью открыла перспективы их применения в решении многих медицинских проблем. В настоящее время остро стоит проблема направленного транспорта лекарственных веществ в клетку.

2.2.1. Способы доставки лекарственных веществ

2.2.1.1. Пассивная доставка

Изначально считалось, что единственным способом доставки противоопухолевых лекарств является направленная доставка. Однако позднее было обнаружено, что полимер-конъюгатные лекарства и наноконтейнеры обладают пролонгированной циркуляцией в кровотоке с последующим пассивным накоплением в опухолях даже при отсутствии специфических лигандов – пассивный механизм накопления.

Пассивная доставка веществ в опухоли может происходить за счёт эффекта повышенной проницаемости и накопления (ППН), впервые наблюдаемого Маэда [78]. Солидные опухоли имеют патофизиологические характеристики, такие как развивающаяся кровеносная система, незрелая архитектура кровеносных сосудов, секреция факторов проницаемости сосудов, приводящих к кровоизлиянию, и незрелые капилляры лимфатической системы [79].

Опухолевая кровеносная система характеризуется повышенным содержанием пролиферативных эндотелиальных клеток, повышенной извилистостью, отсутствием периваскулярных клеток и аномальным развитием мембран, возникающих вследствие быстрого образования кровеносной системы, необходимой для доставки кислорода и питания разрастающейся опухоли. Это приводит к повышенной проницаемости кровеносных сосудов для макромолекул. Более того, лимфатическая дренажная система

функционирует не эффективно из-за незрелости лимфатических капилляров. Таким образом макромолекулы селективно накапливаются продолжительное время в опухоли.

Эффект ППН приводит к пассивному накоплению макромолекул и наночастиц в солидных опухолях, повышая терапевтический индекс и уменьшая побочные эффекты. Также было показано, что в большинстве видов человечески опухолей эффективный размер пор кровеносных сосудов составляет от 200 до 600 нм, что способствует пассивной доставке в опухоли [80]. Было замечено, что секреция окиси азота, простагландинов, брадикинина, основных факторов роста фибропластов в опухолевых тканях, и гиперэкспрессия таких генов как фактор проницаемости сосудов или фактор роста сосудистого эндотелия, приводят к гиперпроницаемости кровеносной системы в опухоли. Следует отметить, что проницаемость сосудов опухоли зависит от прогресса опухоли, её типа и анатомического расположения.

Пассивная доставка липосом

Интерес к липосомам как средствам доставки лекарственных препаратов заключается в том, что стерически стабилизированные липосомы могут не селективно и селективно накапливаться в местах повышенной проницаемости сосудов, что имеет место в инфицированных тканях (таких как опухоли, области инфекций и воспаления) [81;82]. Это, в первую очередь, обусловлено соотношением размера пор в сосудах и диаметра липосом: в основном используют липосомы диаметром 100 нм при среднем размере пор 600 нм. Именно такое соотношение позволяет липосомам выходить из кровотока и накапливаться в местах воспаления. Накопление липосом в патогенных областях приводит к повышению локальной концентрации лекарственного препарата. [83;84]. Это свойство называют пассивной доставкой, способность к которой во многом зависит от комбинации ряда факторов. Во-первых, длительная циркуляция в кровотоке позволяет повысить возможность накопления липосом в области воспаления, но она затруднена за счет адсорбции различных компонентов крови, таких как белки иммунной системы, на липосомальную поверхность. Эта проблема частично решается за счет введения модифицированного полиэтиленгликолем липида [85;86;87].

Во-вторых, необходимо обеспечение доступа липосом к тканям и патогенным зонам. Кроме иммунной системы на пути липосом стоят клетки эндотелия, образующие многослойные образования, отделяющие капилляры от тканей. Однако в местах патологий, таких как воспаления и образование опухолей было обнаружено нарушение

целостности слоя, что позволяет липосомам размера порядка 100 нм проникать внутрь патогенной области [88]. Локализация может составлять до 10% от количества введенных липосом.

2.2.1.2. *Активная доставка*

Активная доставка – это увеличение накопления вещества в месте назначения за счёт специфических биологических взаимодействий, таких как взаимодействия антиген-антитело, или локально-направленного действия – воздействие ультразвуком или нагревание. Для данных целей получают контейнеры, содержащие лиганды или pH-чувствительные элементы в соответствии с биологическими характеристиками опухолевой ткани. Активная доставка основана на специфических характеристиках раковых клеток: гиперэкспрессия поверхностных антигенов, которые в здоровых тканях находятся в незначительном количестве; специфические антигены раковых клеток; более кислая среда относительно здоровой ткани. Специфические взаимодействия между векторными компонентами контейнеров и антигенами приводят к селективному накоплению лекарства в целевой ткани. Важно отметить, что активная доставка усиливает побочные эффекты.

Активная доставка липосом

Активная доставка подразумевает повышенную селективность или аффинность липосом к клеткам, для чего к поверхности липосом ковалентно пришивают лиганд, который обеспечивает специфическое связывание только с определенным типом клеток. Этот подход позволяет повысить доступность препарата в целевых клетках и значительно снижает взаимодействие с другими типами клеток. Однако для того, чтобы произошло связывание лиганда с клеткой необходимо проникновение липосом из сосуда в ткань, то есть пассивная доставка, что замедляет весь процесс [89]. Подбор рецептора для доставки очень важный процесс, который позволяет идентифицировать липосомам цели-мишени и образовать с ними стабильный комплекс. После этого доставка препарата в цитозоль клетки может происходить по нескольким направлениям:

Если рецептор находится снаружи клетки, цитозольная доставка осуществляется за счет слияния мембран липосом и целевой клетки [90]. Эндосомальный захват протекает тогда, когда липосома попадает внутрь клетки. В эндосоме содержатся ферменты и энзимы, которые разрушают липидный бислой и таким образом высвобождают препарат. Такой путь оказывается эффективным для соединений,

которые могут диффундировать из цитозоля к другим органелам клетки. Примером успешного применения этого подхода может служить доставка доксорубицина [91;92]. Помимо этого, рецептором для доставки могут служить и мембранные белковые домены, осуществляющие перенос липосомы внутрь цитозоля [93]. Хотя механизм этого процесса до конца не изучен, но по аналогичному подходу внутрь клетки были доставлены коллоидные частицы.

Важно обеспечить возможность липосом взаимодействовать с клетками и доставлять лекарство в активной форме, что становится возможным в результате нескольких механизмов взаимодействия липосом с клетками:

1) Деградации липосом под действием активных энзимов и ферментов в патогенной области. [94;95].

2) Поглощения фагоцитами патогенной области и диффузия из фагоцитов в несвязанном виде в клетку [96;97]

3) Модификация липосом липидоподобными ПАВ, способными изменять свою конформацию при изменении рН среды позволяет создавать рН-чувствительные липосомальные контейнеры, высвобождающие инкапсулируемое содержимое в результате формирования дефектов в мембране под воздействием конформационных перестроек липидов [98].

2.2.2. Недостатки липосомальных контейнеров

Несмотря на значительный прогресс в области создания липосомальных контейнеров, лишь незначительная часть препаратов на основе липосом нашла применение [99]. Это связано с такими недостатками липосомальных контейнеров как низкая термодинамическая стабильность [35], ограниченная ёмкость контейнера [100], отсутствие векторных свойств и т.д. Предпринимались попытки иммобилизовать липосомы на поверхности твердых носителей (имплантов) с целью локального концентрирования контейнеров и последующего высвобождения заключенного в них лекарства. Однако закрепление липосом на твердом носителе обычно сопровождалось их разрушением с образованием планарных липидных бислоев и неконтролируемым выходом лекарства [101].

В литературе описан пример удачного закрепления липосом на поверхности, обеспечивающий сохранение их целостности [102]. К заранее подготовленным

протеолипосомам, содержащим липид с реакционной группой, ковалентно пришивали функционализированные олигонуклеотиды. Такие модифицированные липосомы липосомы иммобилизовали на подложку из липидного бислоя, содержащего нуклеотиды с комплементарной последовательностью. Иммобилизованные таким способом липосомы сохраняют свою целостность, при этом сохраняя способность диффундировать в плоскости подложки. Главным недостатком этого способа является необходимость введения реакционноспособного липида на стадии приготовления протеолипосом, что ограничивается рядом факторов: протекание побочных реакций с белками, отсутствие контроля за количеством «связавшихся» олигонуклеотидов. Были предприняты попытки к усовершенствованию данной методики путем использования амфифильных олигонуклеотидов, встраивающихся в липидный бислой при мягких условиях [103]. Однако оба этих способа предполагают проведение достаточно сложных процедур предварительной модификации как липосом, так и поверхности.

2.3. Комплексы полиэлектролитов с противоположно заряженными липосомами

Отчасти описанные выше недостатки удалось устранить используя комплексы липосом с линейными полиэлектролитами.

Взаимодействие синтетических полиэлектролитов с поверхностью клеток и модельных объектов – бислойных липидных мембран (БЛМ) является предметом интенсивного исследования на протяжении последних 40 лет [104;105;106;107]. Как известно, поверхность большинства клеток несет суммарный отрицательный заряд, поэтому интерес исследователей, в основном, был сконцентрирован на изучении поведения поликатионов на поверхности БЛМ с включенными анионными липидами. Полученные результаты представляют интерес с точки зрения прогнозирования возможных последствий контакта полиэлектролитов с клеточной поверхностью.

По своему характеру взаимодействие между полимером и липосомами, состоящими из липидов или ПАВ имеет ту же природу, что и образование интерполиэлектролитных комплексов. Возможно несколько вариантов развития взаимодействия.

2.3.1. *Взаимодействия между полимером и липосомами*

2.3.1.1. *Электростатические взаимодействия*

Движущий силой взаимодействия является энтропийный выигрыш свободной энергии, который достигается благодаря высвобождению низкомолекулярных противоионов полимера и липосом. Примером такого взаимодействия может служить система поликатион поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид (ПЭВП)–везикулы, состоящие из яичного лецитина (ЯЛ) и отрицательно заряженного кардиолипина ($КЛ^{2-}$). В этом случае адсорбция сопровождается снижением заряда липосом до точки нейтрализации, после чего происходит перезарядка поверхности в результате адсорбции избыточного количества поликатиона [71;108]. На образование и диссоциацию комплексов этого типа можно влиять, изменяя концентрацию солей. Комплекс ПЭВП– $КЛ^{2-}$ /ЯЛ липосом может полностью диссоциировать в растворах хлорида натрия при достижении концентрации соли порядка 0.2 М [71]. Контролировать образование и диссоциацию комплекса можно изменяя рН, что приводит к протонированию отрицательно заряженного липида и снижает количество эффективного заряда на поверхности липосомы. Другим способом является введение противоположно заряженного полиэлектролита, взаимодействие с которым предпочтительнее для поликатиона по сравнению с адсорбцией на липосоме. Причиной этого является образование большего количества контактов, и, как следствие, увеличение энтропии в системе поликатион-полианион. Все эти способы активно используются для удаления белков с поверхности положительно заряженных липосом [109;110].

2.3.1.2. *Гидрофобные взаимодействия*

Этот тип комплексообразования наиболее эффективен, поскольку проникновение сегментов макромолекул внутрь липидного бислоя приводит к образованию комплексов, устойчивых в солевых растворах [111;112]. Гидрофобная модификация полимеров приводит к улучшению взаимодействия с липосомами различного состава, при этом гидрофобное взаимодействие даже превалирует над электростатическим отталкиванием. Хотя наибольшая стабильность обеспечивается длинными алкильными хвостами, образование стабильных комплексов может наблюдаться и для коротких алкильных групп (например, этила) в случаях высокой плотности макромолекулы на липосомах, что реализуется для сетчатых полиэлектролитов [109;113].

2.3.1.3. *Образование водородных связей*

Такого сорта взаимодействия были выявлены между липосомами и белками-транслоказами, что продемонстрировано на фосфатидилхолиновых липосомах [114]. Также предполагается, что образование водородных связей является движущей силой адсорбции поли(N-изопропилакриламид-глицидилакриламида) на поверхность липосом, содержащих полиэтиленгликоль (ПЭГ) [110;111].

2.3.2. *Структурные перестройки в липидном бислое, вызываемые адсорбцией поликатиона*

Адсорбированный полимер может нарушать распределение липидов в липосомальной мембране. Так в мембране, состоящей из смеси дипальмитоилфосфохолина и кардиолипина, находящейся в жидком фазовом состоянии, липиды распределены равномерно. Методом микрокалориметрии было показано, что адсорбированный поликатион способен вызывать латеральную сегрегацию отрицательно заряженных липидов (образование кластеров) во внешнем слое липидов [115]. Так же некоторые поликатионы, например поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид (ПЭВП), способны индуцировать флип-флоп липидных молекул. Отрицательно заряженный липид перемещается из внутреннего слоя мембраны на внешний, а его место занимает электронейтральный липид. Таким образом, в комплексе реализуется микрофазовое разделение. При добавлении избытка поликатиона весь отрицательно заряженный липид оказывается во внешнем слое мембраны, в то время как внутренний слой формируется только электронейтральными липидами [116]. Образующаяся асимметрия липидного бислоя сохраняется только в присутствии адсорбированного поликатиона. Удаление полимера с поверхности приводило к восстановлению равномерного распределения липидов во внешнем и внутреннем слоях липосом. Стоит отметить, что индуцированные полимером перестройки в липидных мембранах происходили в течение нескольких секунд, в то время как обратный процесс занимал около часа.

На способность поликатионов вызывать структурные перестройки в липидной мембране после адсорбции влияют: фазовое состояние мембраны – в гелеобразном состоянии индуцированных фазовых перестроек не наблюдается; длина цепи поликатиона – молекулы ПЭВП со степенью полимеризации меньше 30 не вызывали

флип-флоп, но вызывали латеральную сегрегацию; природа полимера – поли-L-лизин не вызывает флип-флопа, вызывая латеральную сегрегацию. В то же время стоит отметить, что при этой степени полимеризации поликатион утрачивал способность образовывать петли и хвосты, адсорбируясь на поверхность [115;117]. На ряде полиамфолитов на основе поли-4-винилпириина, алкилированного бромкарбоновыми кислотами с различным числом метиленовых групп, было показано, что длина с уменьшением метиленовой развязки между атомом азота и карбоксильной группы с четырех до двух атомов приводит к последовательному исчезновению у полимеров вызывать флип-флоп, латеральную сегрегацию. Полиамфолит с одной метиленовой группой и вовсе не взаимодействует с отрицательно заряженными липосомами [118].

2.3.3. Обратимость взаимодействия поликатионов с отрицательно заряженными липосомами.

В случае электростатической адсорбции поликатионов на отрицательно заряженные малые липосомы удалить поликатион с поверхности липосомальной мембраны можно двумя способами. Увеличение ионной силы раствора путем введения низкомолекулярного электролита приводит к компенсации энтропийного выигрыша от образования комплекса полимер-липосома, что в свою очередь ведет к десорбции полимера [110]. Другой способ состоит в добавлении к комплексу поликатион-отрицательно заряженная липосома избытка (по заряженным группам) полианиона. В результате конкурентных реакций в растворе появляются свободные липосомы и интерполиэлектролитный комплекс, несущий избыточный отрицательный заряд. Комбинаторная энтропия образующейся системы выше, чем для смеси комплекса поликатион-липосома и свободного полианиона [119]. Описанное выше справедливо для случая, когда мембрана находится в жидкокристаллическом состоянии [75].

Адсорбция поликатиона может быть и необратима. Так наличие в полимере гидрофобных групп обеспечивает необратимость адсорбции, за счет их встраивания в гидрофобную область бислоя (область хвостов липидов) [120]. При адсорбции поликатиона на большие липосомы цепь полимера способна заглубляться в бислой-мембраны больших липосом обладают спонтанной кривизной, что приводит к образованию временных дефектов в мембране, куда и заглубляется поликатион [108].

Дальнейшее увеличение размеров липосом приводит к тому, что поликатион может проникать во внутренний объем липосомы через мембрану [121].

Адсорбция поликатиона на мембраны липосом, находящихся в твердом гелеобразном состоянии, необратима, т.к. в таких мембранах после адсорбции полимера появляется множество дефектов, куда заглобляется поликатион [122].

Поликатион способен вызывать не только нарушение целостности липосомальной мембраны, но и даже ее разрушение [123]. Влияние поликатиона на целостность липосомальной мембраны зависит от содержания анионного липида. Так, для липосом с содержанием КЛ²⁻ 0.45 и выше наблюдается 100% вытекание низкомолекулярной соли при добавлении линейного полиэлектролита. Более того, при добавлении линейной полиакриловой кислоты к полученным комплексам не наблюдалось разрушения комплекса липосома-поликатион, что говорит о разрушении липосомальной структуры и образовании стабильного неvesикулярного комплекса липид-поликатион.

2.3.4. Механизмы агрегации липосом под действием адсорбированного полиэлектролита

Адсорбция полиэлектролита на поверхности заряженных липосом сопровождается агрегацией частиц. Выделяют два режима агрегации, которые протекают параллельно друг другу [124]. Оба режима являются результатом структурных особенностей участников взаимодействия и кинетически зависимы.

Для первого режима, который получил название «структурный» лимитирующей стадией является диффузия липосом и макромолекулы в агрегат. Этот режим реализуется при недостатке поликатиона, то есть до точки электронейтральности комплекса. Процесс адсорбции сопровождается деструкцией воды приповерхностного слоя липосом, нейтрализацией заряда липидов и внесением новых зарядов в систему поликатионом. В результате липосомы теряют свою коллоидную стабильность за счет снижения стабилизирующих потенциалов, что приводит к агрегации липосом. Такой механизм протекания процесса агрегации дает относительно мелкие частицы (100-500 нм) по причине небольшой эффективности соударений между кластерами.

Во втором механизме («цепной механизм») определяющим являются особенности строения макромолекулы, в частности, подвижность сегментов. Лимитирующей стадией является благоприятная для образования контакта ориентация заряженных звеньев

полимера. Подобный режим характерен для полиэлектролитов высокой степени полимеризации, а также в диапазоне концентраций полимера вблизи и выше точки нейтрализации поверхностного заряда липосом. Механизм, как и в предыдущем случае, заключается в адсорбции сегментов макромолекулы на одну липосому. Отличие в том, что только часть звеньев адсорбируется на везикулы. Несвязанные сегменты способны, блуждая в растворе, адсорбироваться на другие липосомы. В результате протекания процесса образуются частицы с микрометровым размером, эффективность соударений кластеров выше, а также проявляется дополнительный эффект связывания полимера [125].

2.3.5. Стабилизация липосом от агрегации под действием поликатиона

Стабилизации от агрегации в системе поликатион-липосома. можно добиться, создавая на поверхности комплекса «электростатический» барьер [71;108;124;125;126]. Дополнительно к нему можно создать «стерический» барьер за счет введения ПЭГ-модифицированного липида, что позволит повысить устойчивость липосом к агрегации и вклад «структурного механизма» агрегации будет нивелирован. С другой стороны, такая модификация не окажет сильного воздействия на агрегацию при «цепном механизме». Для создания «электростатического» барьера необходимо, чтобы в процессе адсорбции поликатиона происходило увеличение положительного заряда комплекса, что сможет предотвратить агрегацию. Авторы [127] утверждают, что использование везикул, содержащих положительно и отрицательно заряженные липиды в равном соотношении, позволяет стабилизировать образующийся комплекс.

2.3.6. Влияние адсорбции полиэлектролитов на липосомы на скорость транс-мембранного транспорта низкомолекулярных веществ

В работах [71;128;110;129] описывается ускорение транспорта соли (NaCl) и доксорубина через липидную мембрану в результате адсорбции полиэлектролитов и белков на противоположно заряженные липосомы. Было показано, что адсорбция ПЭВП на анионные липосомы сопровождается образование доменов отрицательно заряженного компонента, что приводит к образованию дефектов на границе доменов. Именно в местах дефектов и происходит образование пор [71]. С другой стороны полиэлектролиты с подвижными сегментами способны образовывать петли. В результате взаимного отталкивания петель ускоряется «флип-флоп» липидов, снижается

латеральное давление в бислое, и уменьшается плотность гидрофобной его части, что приводит в конечном счете к повышению проницаемости мембран.

2.3.7. Взаимодействие комплексов анионные липосомы-поликатион с клетками

В ходе недавних исследований было показано [130], что использование комплексов анионных липосом с поликатионом не только существенно уменьшает токсичность поликатиона (токсичность комплексов липосом с поликатионом близка к токсичности самих липосом), но и увеличивает аффинность таких комплексов к клеткам по сравнению с обычными липосомами. Было показано, что добавление к клеткам линии HeLa липосом, заполненных Докс (противоопухолевый препарат на основе доксорубицина), приводило к появлению яркой флуоресценции только на поверхности клеток. В то же время, замена липосомальных контейнеров на содержавшие Докс комплексы липосом с поликатионом (нанокапсулы) сопровождалась появлением флуоресценции в ядрах клеток. Причем этот эффект усиливался по мере увеличения количества адсорбированного на липосомальной мембране поликатиона. Нанокапсулы с суммарным положительным поверхностным зарядом обеспечивали проникновение в клетки большего количества Докс, чем нанокапсулы с суммарным отрицательным зарядом. Также было показано, что добавление липосом, заполненных Докс, к клеткам с множественной лекарственной устойчивостью не приводит к попаданию препарата внутрь клетки, тогда как использование положительно заряженных комплексов поликатион – липосома способствует проникновению Докс внутрь клетки. Исследование токсичности таких комплексов на мышах показали, что данные комплексы не оказывают токсического действия.

Из литературного обзора следует, что модификация липосом линейными полиэлектролитами позволяет существенно улучшить их физикохимические свойства и упрощает возможность использования таких конструкций в биомедицинских целях. Однако, ряд вопросов остается нерешенным. Так, при использовании таких конструкций невозможно контролировать количество адсорбированных липосом, а также получать системы с разнозаполненными липосомами в заданном соотношении. При модификации анионных липосом линейными полкатионами наблюдается неконтролируемая

агрегация частиц. Также к недостаткам таких систем можно отнести способность линейных поликатионов разрушать липосомальную мембрану.

В данной работе представлен способ устранения перечисленных выше недостатков полимер-липосомальных наноконтейнеров путем замены линейного поликатиона на катионные частицы отличной структуры – ядро с привитыми на него катионными цепями. Кроме того рассмотрен способ получения мультилипосомального контейнера, способного к высвобождению содержимого при изменении pH среды.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

3.1. Используемые реагенты.

3.1.1. *Фосфолипиды и ПАВ.*

Кардиолипин (КЛ), раствор в этаноле с концентрацией 25 мг/мл; пальмитоилолеоилфосфатидилсерин (ПОФС); диолеоилфосфатидилхолин (ДОФХ); дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ); дипальмитоилфосфатидилсерин (ДПФС); липиды фирмы Avanti Polar Lipids; меченый флуоресцеин-изоцианатом (ФИТЦ, $C_{12}H_{11}O_5NS$) дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ДПФЭ-ФИТЦ) фирма “Sigma” (США), тритон X-100 “Sigma” (США), липидоподобный ПАВ транс-4,5-дидодецилоксикарбонил-2-морфолиноциклогексанол (ДОП), обладающий конформационным переходом, синтезирован по методике [131]. Все липиды и ПАВ использовали без дополнительной очистки.

3.1.2. *Полимеры.*

Сферические поликатионные щетки (СК⁺) синтезировали по методике [132] графт-полимеризацией триметиламиноэтилметакрилатаммоний хлорида на поверхности монодисперсных полистирольных латексных частиц с диаметром 100 нм [133]. Среднее число поликатионных цепей на частицу составляло 600, средняя длина цепей – 65 нм. Концентрация СК⁺ приведена в молях кватернизованных звеньев в литре раствора.

Блок-сополимер полиаргинина (длина блока $x = 60$ мономерных звеньев) и полилейцина (длина блока $y = 20$ мономерных звеньев) $R_{60}L_{20}$.

3.1.3. *Низкомолекулярные реактивы.*

В работе использовали хлороформ ($CHCl_3$), метанол (CH_3OH), тетрагидрофуран (ТГФ) марки х.ч. “Реахим ” (Россия) без дополнительной очистки, раствор этанола (C_2H_5OH) с концентрацией 95 % “Ферейн” (Россия).

Буфер ТРИС с $pH = 7$ и $pH = 8$ готовили, используя трис (трис-(гидроксиметил)-аминометан) марки х.ч., “Реахим ” (Россия).

Буферные растворы с концентрацией 10^{-2} М и 10^{-3} М готовили по навеске, pH полученных растворов определяли на pH-метре фирмы «Hanna».

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

Для приготовления липосом, содержащих гидрофильный краситель, использовали раствор лакмуса “Ferak” (Берлин) в буре (буферный раствор концентрацией 10^{-2} М, рН = 9,2) с начальной концентрацией 0.05 г/мл, который затем два раза фильтровали с помощью фильтра, диаметр пор которого составлял 450 нм.

Для приготовления липосом, содержащих гидрофобный краситель, использовали раствор 1,1'-диоктадецил-3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат (ДИЛ) в хлороформе концентрацией 1.67 мг/мл.

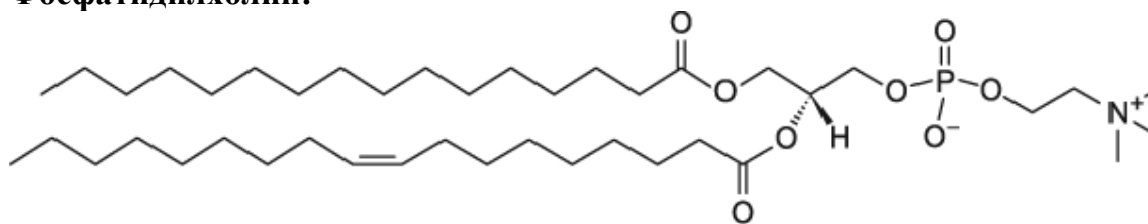
Для приготовления буферного раствора с рН = 5 использовали ацетатный буфер.

3.1.4. Вода.

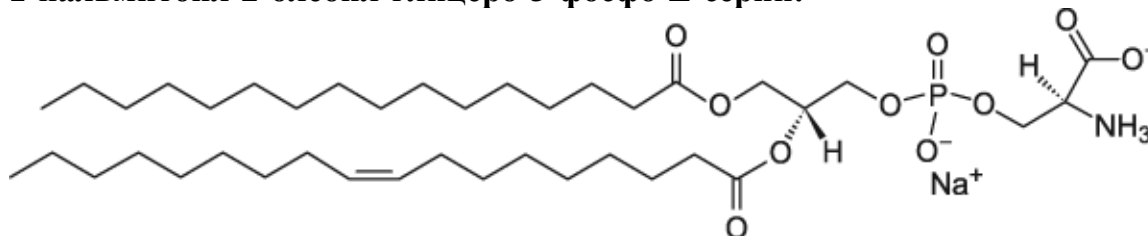
Воду очищали двойной перегонкой с последующим пропусканием через систему “Milli-Q” фирмы “Миллипор” (США), включающую ионообменные, адсорбционные колонки для глубокой очистки от органических примесей и фильтры для удаления крупных частиц. Очищенная таким образом вода имела удельную электропроводность $0,56 \mu\text{S}/\text{cm}$.

3.1.5. Структурные формулы используемых веществ

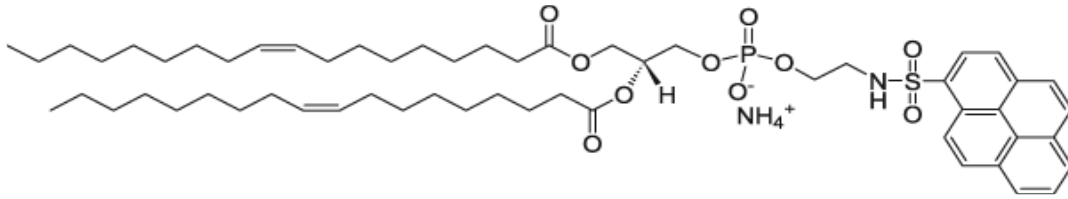
Фосфатидилхолин:



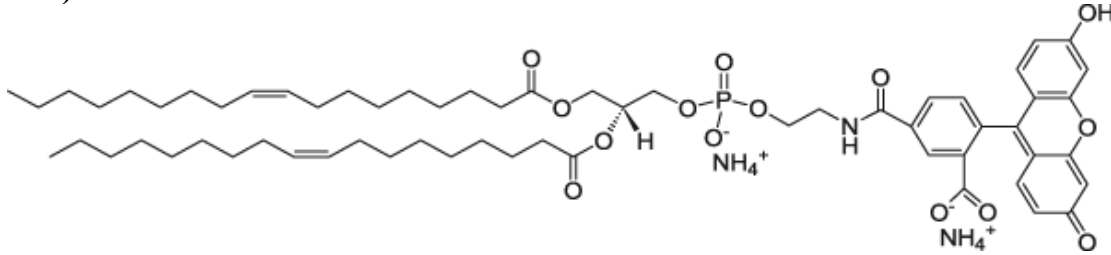
1-пальмитоил-2-олеоил-глицеро-3-фосфо-L-серин:



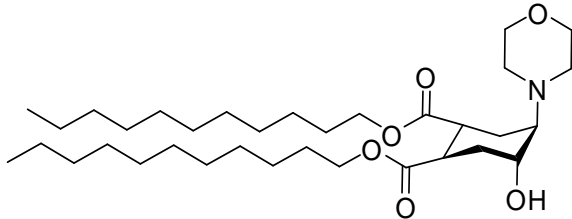
1,2-диолеил-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(1-пиренсульфонил) (аммонийная соль):



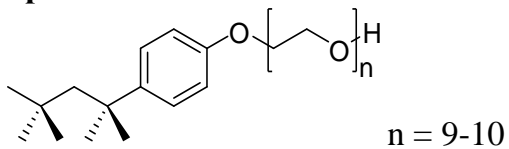
1,2-диолеил-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(карбоксифлуоресцеин) (ДОФЭА-КФ):



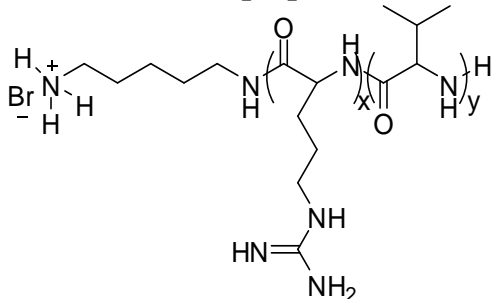
Транс-3,4-дигидроксипиперидин (ДОП):



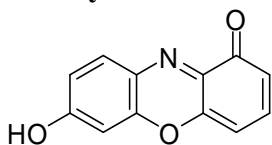
Тритон X-100:



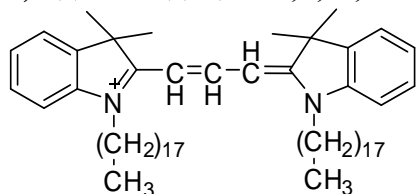
Блок-сополимер аргинина с лейцином:



Лакмус:



1,1-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндо-карбоцианин перхлорат (ДИЛ):



3.2. Объекты исследования.

3.2.1. Получение липосом.

Малые моноламеллярные липосомы получали методом озвучивания [9]. Расчётное количество растворов липидов смешивали и тщательно удаляли органический растворитель на вакуумном роторном испарителе “Rotovapor” фирмы “Buchi” (Швейцария) при температуре $T = 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ и скорости вращения 90 об/мин. Образующуюся тонкую плёнку липидов диспергировали в необходимом количестве буфера. 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 4710 (фирма “Cole-Parmer Instrument”, США). Полученные липосомы отделяли от титановой пыли на центрифуге в течение 5 минут при скорости 13 тыс. об/мин и использовали в течение 3 суток.

Малые моноламеллярные липосомы из ДПФХ и ПОФС готовили аналогично методике, описанной выше, проводя отгонку растворителя и озвучивание при температурах $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ соответственно.

Также в работе использовали липосомы, содержащие 0.1 анионного липида и включающие третий компонент – липид-переключатель ДОП. Для формирования таких липосом в процессе смешения растворов липидов часть нейтрального липида заменялась на ДОП таким образом, чтобы мольное соотношение липидов было следующим: ПОФС/ДОП/ФХ = 1/3/6.

3.2.2. Получение флуоресцентно меченных липосом, липосом, содержащих ДИЛ и липосом, наполненных солью и лакмусом

Для получения меченных липосом в процессе формирования липидной пленки к смеси растворов липидов добавляли раствор, содержащий флуоресцентно меченый липид (0.05 масс. % от общего содержания липидов).

Для формирования липосом, содержащих ДИЛ в области гидрофобных хвостов, в процессе формирования липидной пленки к смеси растворов липидов добавляли раствор ДИЛ в хлороформе, содержащий 0.8 масс. % ДИЛ от общего содержания липидов.

Во время приготовления липосом поддерживалась постоянная температура раствора. Температура подбиралась таким образом, чтобы в процессе приготовления все компоненты находились при температуре выше фазового перехода, т.е. в «жидком» состоянии.

При получения липосом, наполненных лакмусом или солью, к сформированной липидной пленке вместо буферного раствора добавляли раствор лакмуса или соли (1 М). Время озвучивания было увеличено до 900 секунд. Затем проводили диализ: в течение суток в случае наполненных лакмусом липосом (в буре с концентрацией 10^{-3} М), и в течение полутора часов – для наполненных солью (45 минут в дистиллированной воде, затем 45 минут в буфере ТРИС с концентрацией 10^{-3} М).

3.2.3. Получение полипептидных везикул.

Полипептидные везикулы получали способом, описанным ниже. В эпендорф помещали 5 мг блочного полипептида, добавляли 125 мкл тетрагидрофурана (ТГФ), встряхивали на встряхивателе Vortex до образования кашеобразной массы и озвучивали в бане в течение 300 с. Далее добавляли 125 мкл буфера и процедуру встряхивания и озвучивания повторыли до образования прозрачного раствора. Затем добавляли к раствору $4 \times 62,5$ мкл ТГФ, после каждого добавления растворителя образец встряхивали. В конце раствор озвучивали в ультразвуковой бане. Полученные везикулы диализовали против буфера в течение 24 часов со сменой буфера через два часа после начала диализа. Размер полученных таким способом везикул колебался в диапазоне 200-600 нм. Концентрацию заряженных групп определяли титрованием.

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. Электрофоретическая подвижность

Электрофоретическая подвижность липосом и их комплексов с полиэлектролитами была измерена с использованием лазерного микроэлектрофореза на приборе Brookhaven 90 Plus (Brookhaven Instruments Company, США) в термостатируемой ячейке по стандартной методике, предложенной производителем.

3.3.3. Флуориметрия

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

3.3.4. Спектроскопия

Аналитическое определение концентраций липосом, содержащих лакмус и ДИЛ, в растворе проводили методом спектроскопии на спектрофотометре UV-Mini (Shimadzu) по характеристическим полосам поглощения. Для этого измеряли оптическую плотность растворов различной концентрации при длине волны $\lambda = 586$ нм для липосом, содержащих лакмус во внутреннем объеме, и $\lambda = 551$ нм для липосом, содержащих ДИЛ в области гидрофобных хвостов, в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1.0 см.

3.3.5. Кондуктометрия

Измерение электропроводности растворов проводили на кондуктометре CDM 83 Radiometer (Дания). Для измерений использовали полиэтиленовую кювету, объем пробы составлял 1 мл.

3.3.6. Препаративное центрифугирование

При приготовлении липосом осаждение металлической пыли проводилось на центрифуге “J-11” фирмы “Beckman”(Австрия). Время и скорость вращения ротора выбирали таким образом, чтобы при ультрацентрифугировании не происходило осаждения водорастворимых компонентов системы.

Для отделения БСМ от раствора использовалось центрифугирование (6000 об/мин.), которое проводилось на центрифуге Galaxy Mini (VWR International, США).

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

3.3.7. Потенциометрия

Измерения pH растворов проводились на pH-метре pH-210 фирмы “Hanna”. В качестве измерительного электрода использовался стеклянный электрод для измерения pH марки HI 1131В. Перед каждым измерением прибор калибровали по стандартным буферным растворам с pH = 4.01 и pH = 7.01. Точность определения pH растворов составляла 0.01 ед. pH.

3.3.8. Криогенная трансмиссионная электронная микроскопия

Образцы для криогенной трансмиссионной электронной микроскопии готовили в специализированной камере, в которой поддерживалась желаемая температура и влажность. Капля суспензии липосом или комплекса липосом с полимером наносилась на медную сетку, покрытую перфорированной углеродной пленкой. Избыток суспензии удаляли фильтровальной бумагой. Затем образец погружали в жидкий этан, находящийся при температуре замерзания. Обезвоженный таким образом образец помещали в охлаждающую ячейку Oxford CT-3500 и исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе Philips CM 120 при температуре -180 °С в режиме малых доз электронных пучков, чтобы предотвратить радиационное повреждение образца. Изображения оцифровывали и записывали на компьютер с помощью камеры Gatan 791 MultyScan CCD camera [134].

3.3.9. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Исследования фазовых переходов в липосомах проводили методом микрокалориметрии на дифференциальном адиабатном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (Специальное бюро биологического приборостроения при Российской академии наук, СССР). Калориметрический узел данного прибора содержал две калориметрические камеры, идентичные по массе и объему, окруженные двумя концентрическими адиабатирующими экранами и термостатом. Калориметрическая камера представляла собой капилляр, согнутый в цилиндрическую спираль с внешним диаметром 1.6 мм (объем 0.4659 мл). Разность тепловых мощностей компенсировалась

электрическим путем. Калибровочная мощность составляла 25×10^{-6} Вт. В камере было создано избыточное давление для исключения погрешностей, связанных с выделением газа или кипением. Исследуемые образцы прогревали со скоростью $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$ в температурном интервале $20\text{-}55 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.10. *Прижизненное окрашивание клеток метилтетразоловым синим*

Для оценки цитотоксичности полипептидных везикул и их комплексов с липосомами использовали МТТ-тест, основанный на способности митохондриальных дегидрогеназ и эстераз конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ) жёлтого цвета в пурпурный формазан, который кристаллизуется внутри клетки.

Формаза́н образуется только в живых клетках, и его количество позволяет рассчитать процент выживших клеток от их общего числа после добавления какого-либо реагента. К монослойной культуре добавляли раствор реагента в сыворотке DMEM, содержащей соли, аминокислоты и витамины, необходимые для жизни и размножения клеток. Количество клеток во всех экспериментах было одинаковым, и плотность засева составляла около 70% от общей площади ячейки. Раствор реагента выдерживали с клетками в течение 1 часа, добавляли МТТ, и инкубировали клетки в течение еще 1 часа. Затем удаляли верхний слой жидкости, и переводили формаза́н в раствор добавлением при помощи ДМСО. Раствор фотометрировали при длине волны $\lambda = 550 \text{ нм}$. Сопоставляя изменение оптической плотности раствора по отношению к контролю, определяли количество формаза́на в каждой пробе.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

4.1. Комплексы поликатионных щёток с анионными липосомами

4.1.1. *Комплексы с участием КЛ²⁻/ФХ липосом*

За взаимодействием анионных липосом, содержащих в качестве отрицательно заряженного компонента кардиолипин, со сферическими поликатионными щётками следили по изменению поверхностного заряда частиц. На Рис. 6 представлены зависимости электрофоретической подвижности (ЭФП) комплексов от концентрации липосом, добавленных в систему. Образование комплексов поликатионных щеток с

липосомами с $\nu = 0.05$ (кривая 1) сопровождается уменьшением заряда частицы, который достигает нулевого значения при $C_{\text{липосом}} = 0.88$ мг/мл. Данная концентрация соответствует 10^{-4} М анионных липидов, что эквивольно концентрации положительных зарядов в системе. Дальнейшее добавление липосом приводит к перезарядке поверхности комплексов. Увеличение доли анионного липида в липосомах приводит к уменьшению количества липосом требуемого для нейтрализации заряда щёток. Причём количество отрицательно заряженного липида в нейтральном комплексе остаётся эквивольным количеству положительно заряженных групп щёток. Величина максимального отрицательного значения ЭФП зависит от доли кардиолипина в мембране и растёт по мере увеличения отрицательного заряда липосом. Так для комплексов с липосомами с долей анионного липида 0.05 перезарядка практически не происходит и значение ЭФП держится на значениях близких к нулю (кривая 1), в то время как для липосом с содержанием кардиолипина 0.3 и 0.4 (кривые 4 и 5) ЭФП максимальное достигает -3 (мкм/с)/(В/см).

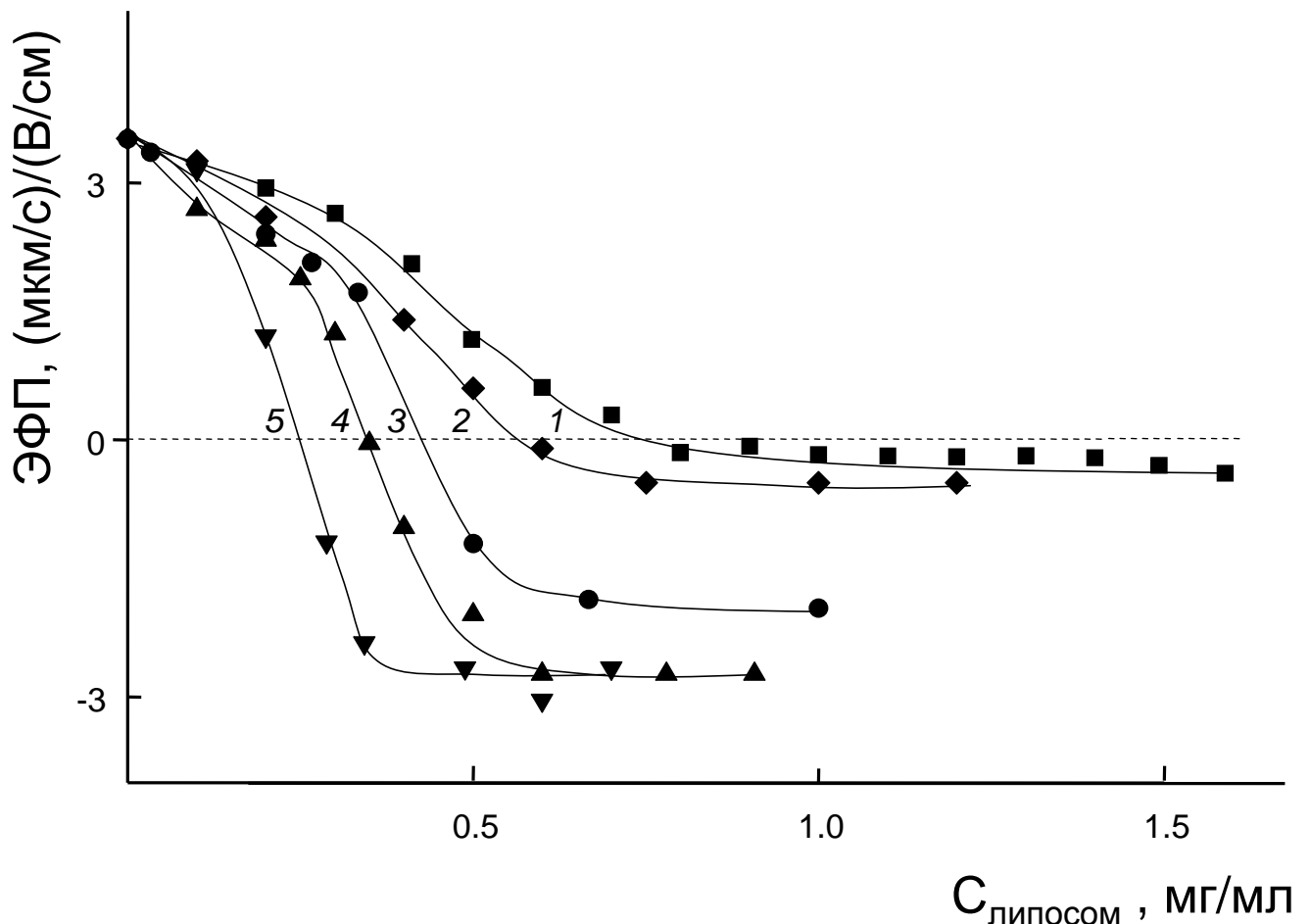


Рис. 6. Зависимость ЭФП частиц комплекса $СК^+$ -липосомы $КЛ^2/\Phi X$ от концентрации липосом.

Содержание анионного липида в липосомах $\nu = 0.05$ (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4), 0.4 (5). $[СК^+] = 1 \times 10^{-4}$ осново-моль/л; 10^{-2} М обратный буфер рН 9.2, 20 °С.

Параллельные измерения размеров частиц (Рис. 7) показали, что при начальном добавлении суспензии липосом к поликатионным щёткам существенного изменения гидродинамического диаметра частиц не наблюдается. Затем, при достижении в системе отношения отрицательного заряда к положительному 1:2, размер частиц резко начинает возрастать и достигает своего максимума для нейтрального комплекса. Дальнейшее добавление липосом приводит к уменьшению размеров и при избытке отрицательного заряда размеры частиц достигают ~ 400 нм.

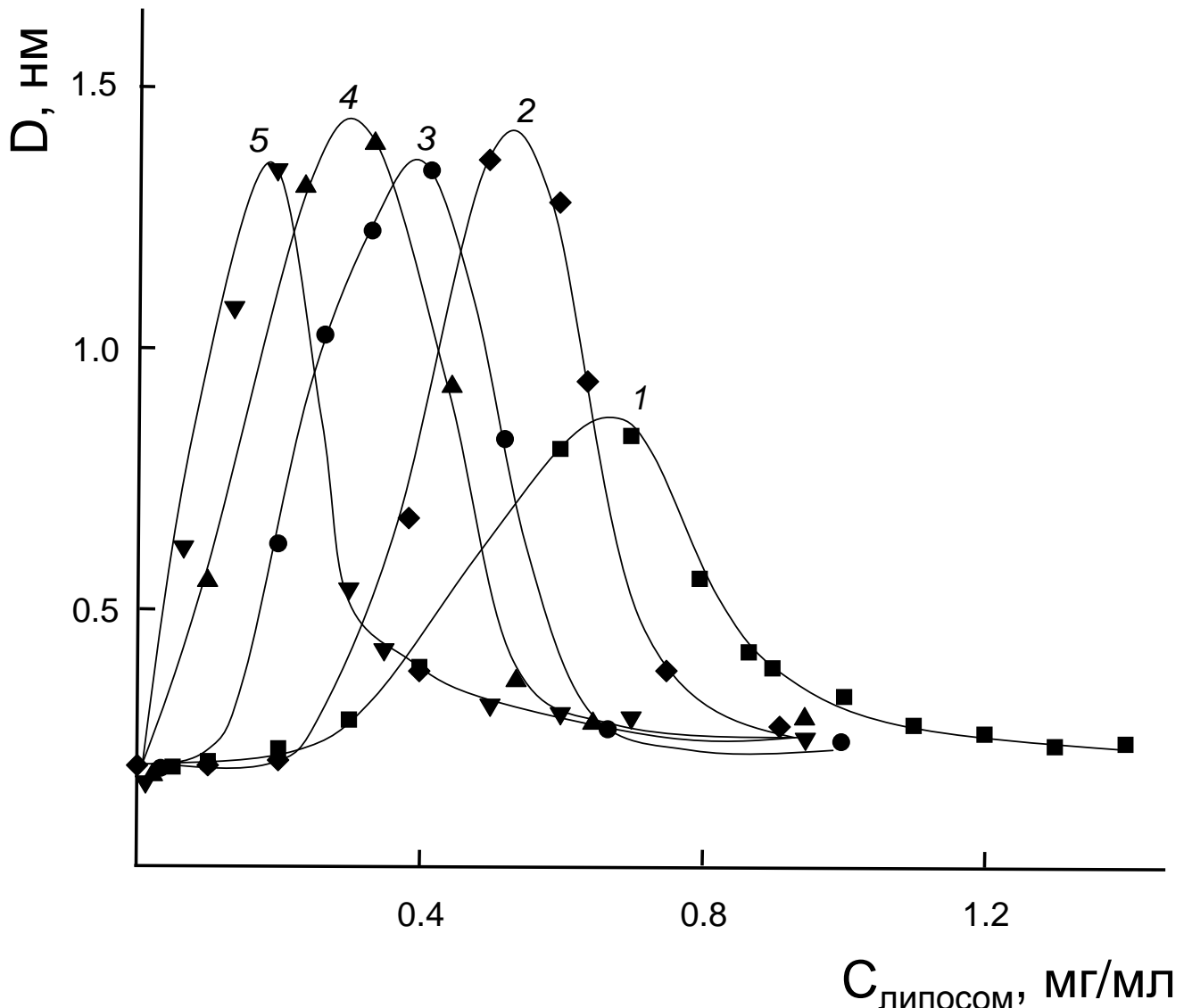


Рис. 7. Зависимость гидродинамического диаметра частиц комплекса СК⁺-липосомы КЛ²⁻/ФХ от концентрации липосом. Содержание анионного липида в липосомах $v = 0.05$ (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4), 0.4 (5). $[СК^+] = 1 \times 10^{-4}$ осново-моль/л; 10^{-2} М боратный буфер рН 9.2, 20 °С.

Для регистрации связывания анионных липосом с поликатионными щётками был использован метод флуоресценции. К суспензии СК⁺ добавляли суспензию ФИТЦ-меченых липосом, СК⁺ с адсорбированными липосомами отделяли

центрифугированием и измеряли интенсивность флуоресценции супернатантов, которую пересчитывали в концентрацию липосом, используя соответствующую калибровочную кривую. На Рис. 8 представлены зависимости концентрации липосом в супернатанте от общей концентрации липосом в системе. Видно, что все липосомы количественно связывались с СК+ вплоть до некоторой концентрации $L_{\text{пред}}$ (мг/мл), выше которой липосомы начинали появляться в растворе. Величина $L_{\text{пред}}$ зависела от состава липосом и уменьшалась по мере возрастания доли анионного липида в липосомальной мембране.

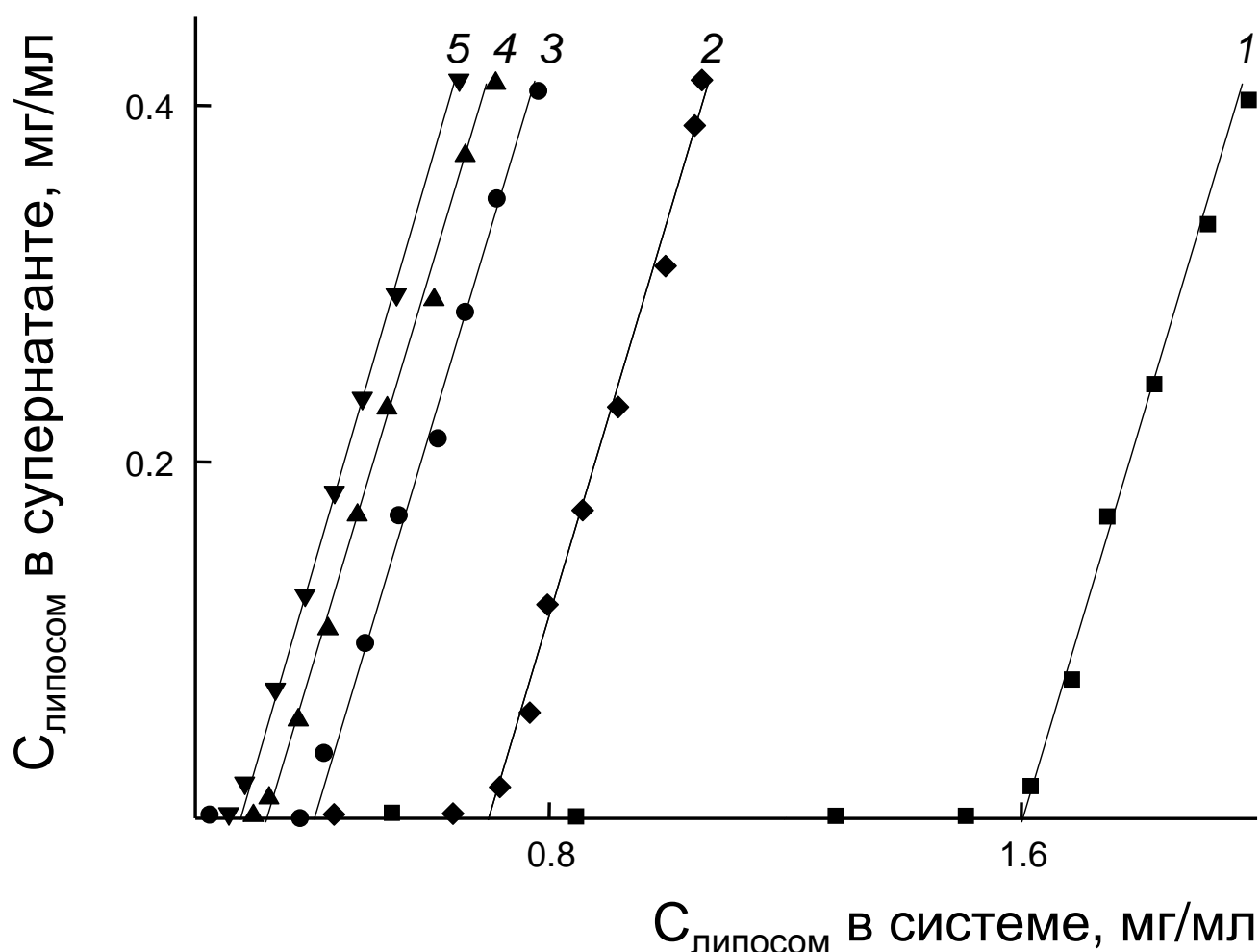


Рис. 8. Зависимость концентрации $KL^2/\Phi X$ липосом в надосадочной жидкости от общей концентрации липосом в системе. $\nu = 0.05$ (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4), 0.4 (5); $[СК+] = 1 \times 10^{-4}$ основ. моль/мл; 10^{-2} М боратный буфер, рН 9.2; 20 °С.

Полученные результаты позволили рассчитать предельное количество липосом, адсорбированных на одной поликатионной щетке, N . Для этого $L_{\text{пред}}$ была представлена в виде количества липосом в литре раствора ($C_{\text{л}}$):

$$C_{\text{Л}} = (L_{\text{пред}} \times S \times N_{\text{а}}) / (2\pi d^2 \times M), \quad (1)$$

где S – площадь, приходящаяся на одну липидную молекулу (0.7 нм^2), d – средний диаметр липосомы (50 нм), M – средняя молекулярная масса липида (760 Да), $N_{\text{а}}$ – число Авогадро. Количество СК^+ в литре раствора ($C_{\text{К}}$) было рассчитано в предположении, что основной вклад в вес СК^+ вносит полистирольное ядро:

$$C_{\text{К}} = 6K / (\pi D^3 \times \rho), \quad (2)$$

где K – концентрация СК^+ , в нашем случае 0.38 мг/мл , D – диаметр полистирольного ядра (100 нм) и ρ – его плотность (1.05 г/см^3). Это позволило рассчитать N как

$$N = C_{\text{Л}} / C_{\text{К}} = (L_{\text{пред}} \times S_1 \times N_{\text{а}} \times D^3 \times \rho) / (6C_{\text{К}} \times d^2 \times M) \quad (3).$$

Подстановкой экспериментально определенных величин $C_{\text{Л}}$ (Рис. 8) в уравнение 3 была получена зависимость N от доли анионного липида в мембране ν (Рис. 9). Эта зависимость имеет нелинейный характер: величина N резко падает от ≈ 80 до ≈ 40 при увеличении ν от 0.05 до 0.1 и становится равной 15 при $\nu = 0.4$.

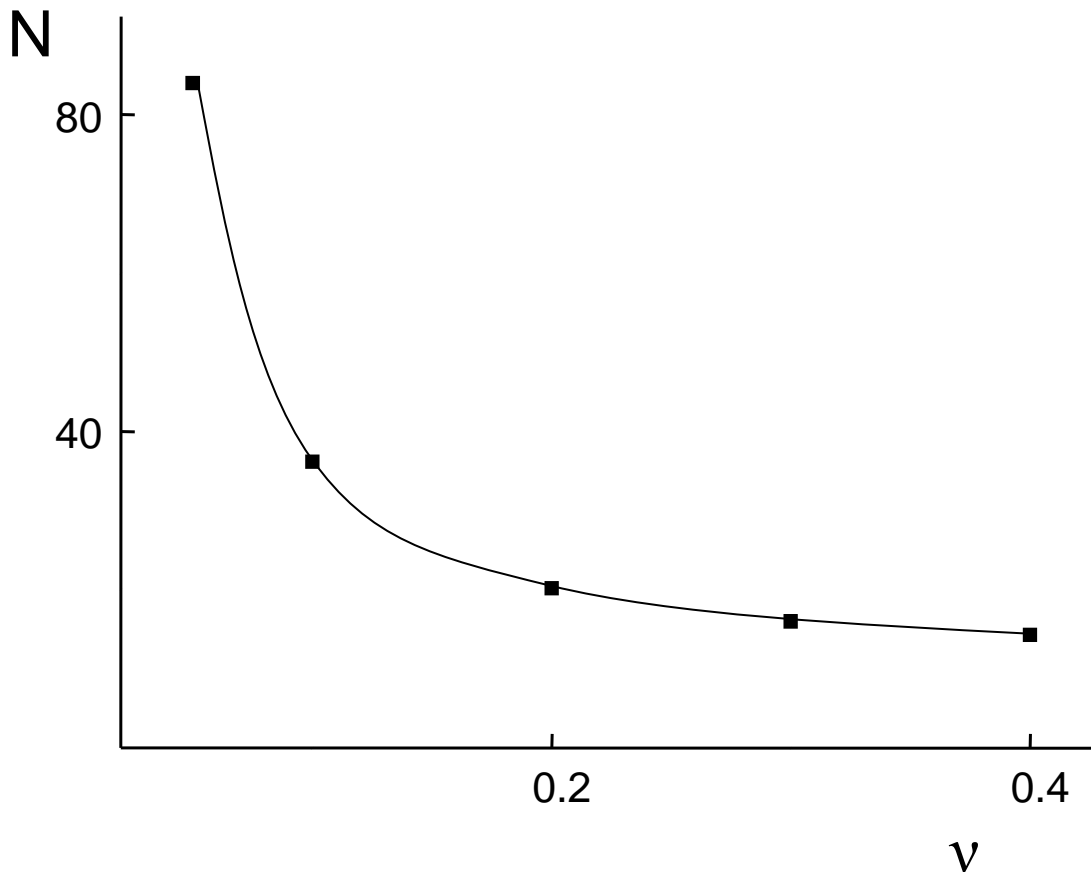


Рис. 9. Зависимость количества $\text{КЛ}^{2-}/\text{ФХ}$ липосом, связанных с одной СК^+ , от доли заряженного липида в мембране. 10^{-2} М боратный буфер, $\text{pH } 9.2$; $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Принципиальный вопрос касается стабильности комплексов к диссоциации на составляющие компоненты – СК^+ и липосомы в водно-солевых средах. Катионные

полимеры являются эффективными тушителями флуоресценции [135]. Поэтому за формированием и последующей диссоциацией комплексов следили, регистрируя интенсивность флуоресценции ФИТЦ-меченого липида, встроенного в липосомальную мембрану. Добавление суспензии СК+ к суспензиям меченых липосом всех составов приводило к уменьшению интенсивности флуоресценции метки (Рис. 10). Последующее добавление раствора соли (NaCl) оказывало различный эффект в зависимости от содержания анионного липида в адсорбированных липосомах.

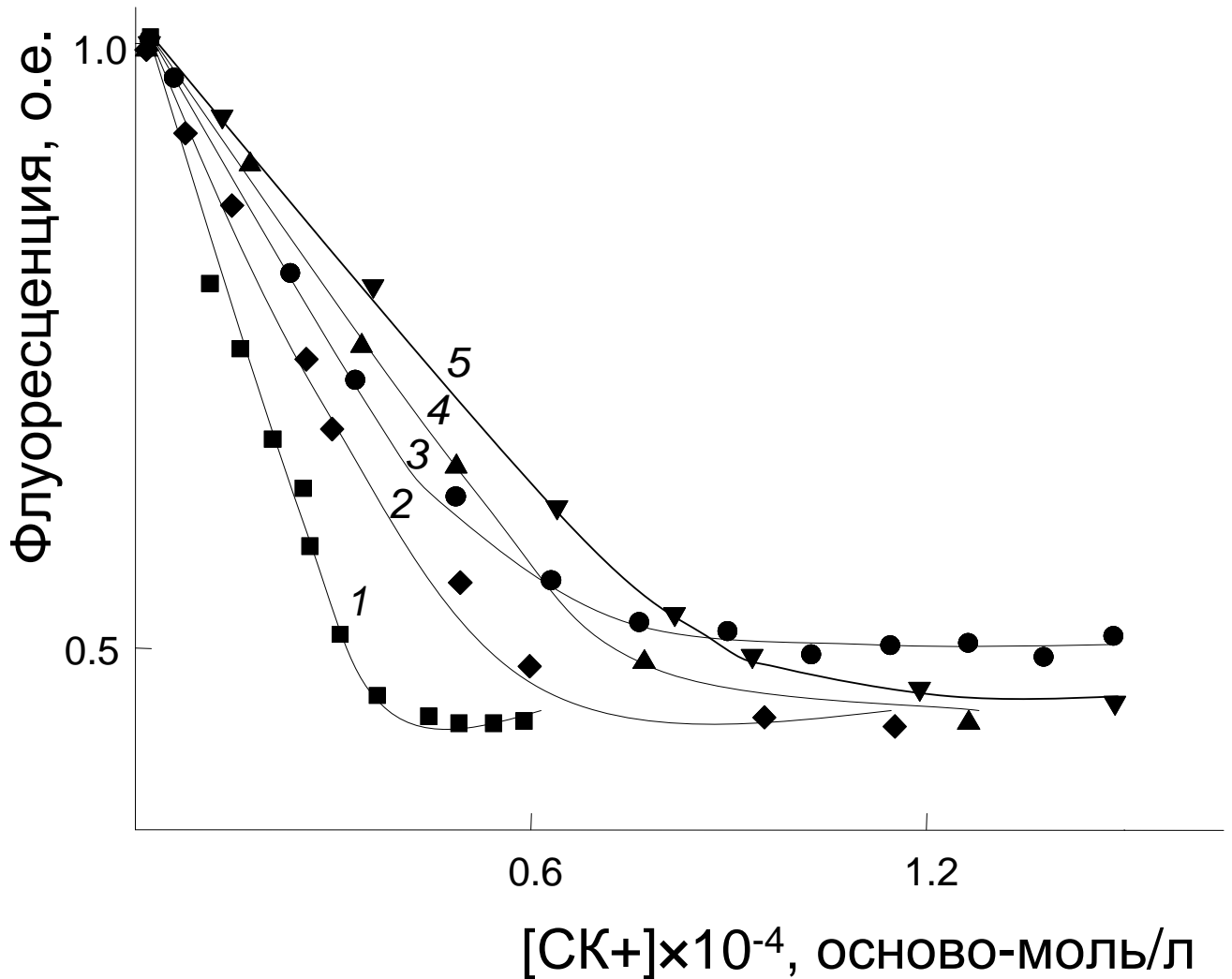


Рис. 10. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции в системе СК+/липосомы КЛ²⁻/ФХ от концентрации добавленных СК+. $\nu = 0.05$ (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4), 0.4 (5); 10^{-2} М боратный буфер, рН 9.2; 20°C.

Комплексы липосом с $\nu = 0.05$ полностью диссоциировали при $[\text{NaCl}] = 0.15$ М, комплексы липосом с $\nu = 0.1$ при $[\text{NaCl}] = 0.25$ М, в то время как липосомы с $\nu \geq 0.2$ формировали комплексы, которые не диссоциировали в растворах с концентрацией соли до 1.2 М (Рис. 11).

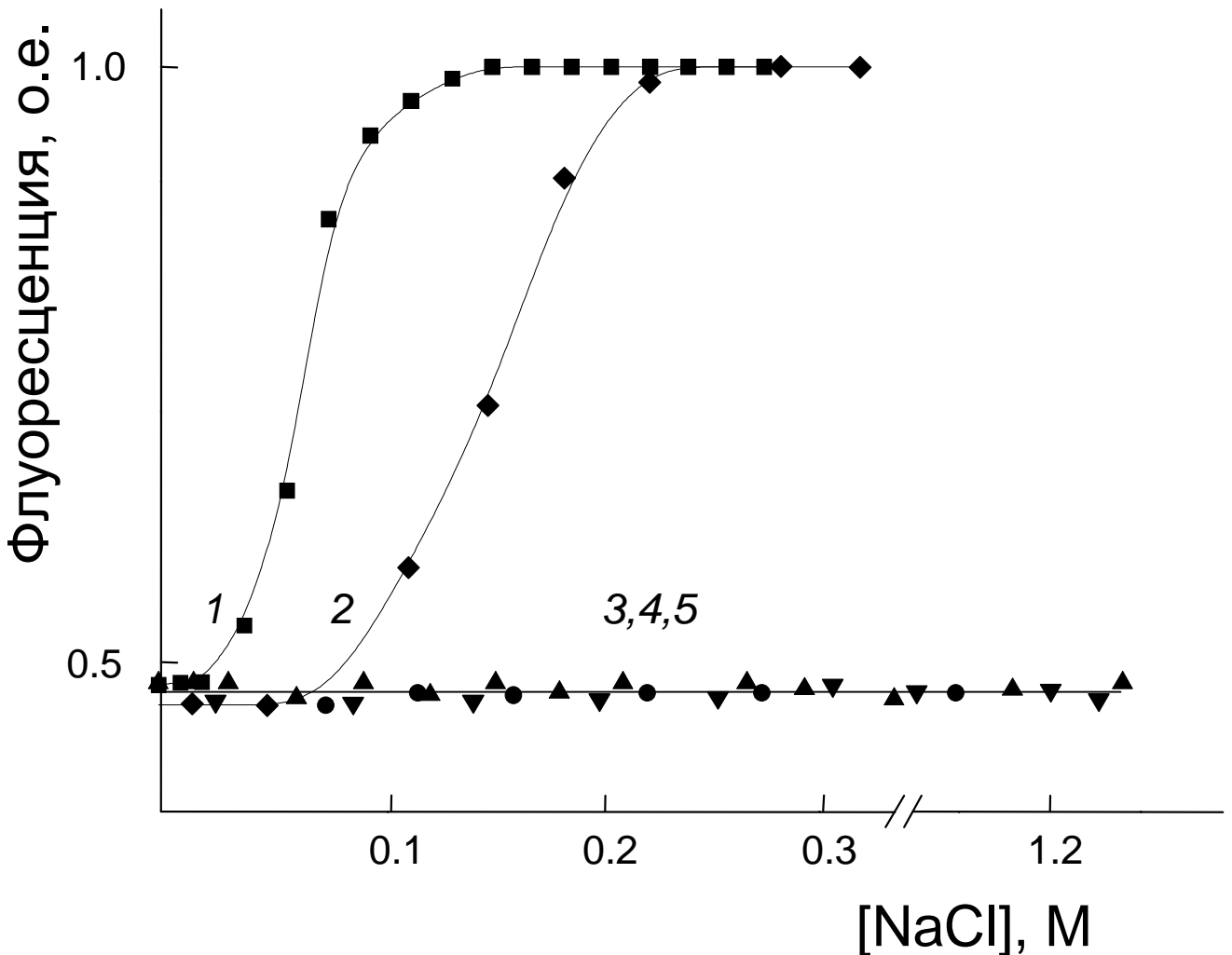


Рис. 11. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции в системе СК⁺/липосомы КЛ²⁻/ФХ от концентрации добавленной соли NaCl. $v = 0.05$ (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4), 0.4 (5); концентрация липосом 1 мг/мл; $[КЛ^{2-}]/[СК^+] = 2/3$; 10^{-2} М боратный буфер, pH 9.2; 20°C .

Необратимое связывание липосом с СК⁺ могло быть результатом встраивания фрагментов привитых поликатионных цепей в липосомальные мембраны. Такое встраивание должно было сопровождаться образованием дефектов в липидном бислое и вытеканием водного содержимого из липосом в окружающий раствор. Целостность ФХ/КЛ²⁻ липосом в комплексе с СК⁺ анализировали, используя метод кондуктометрии. Для этого были приготовлены липосомы, внутренний водный объем которых был заполнен 1 М раствором NaCl. Нарушение целостности мембраны приводило к увеличению электропроводности липосомальной суспензии. Полученный результат сравнивали с электропроводностью, полученной в ходе контрольного эксперимента – разрушения липосом в присутствии избытка детергента (Тритона X-100), которую принимали за 100%. Оказалось, что добавление липосом с $v \leq 0.3$ к суспензии СК⁺ не влияло на электропроводность системы (Рис. 12, кривые 1-4), в то время как добавление

липосом $v = 0.4$ приводило к возрастанию электропроводности (кривая 5). Иными словами, после связывания с СК⁺ целостность липосом с $v \leq 0.3$ сохранялась, увеличение доли анионного липида до 40 мол% сопровождалось появлением дефектов, через которые происходило вытекание раствора NaCl.

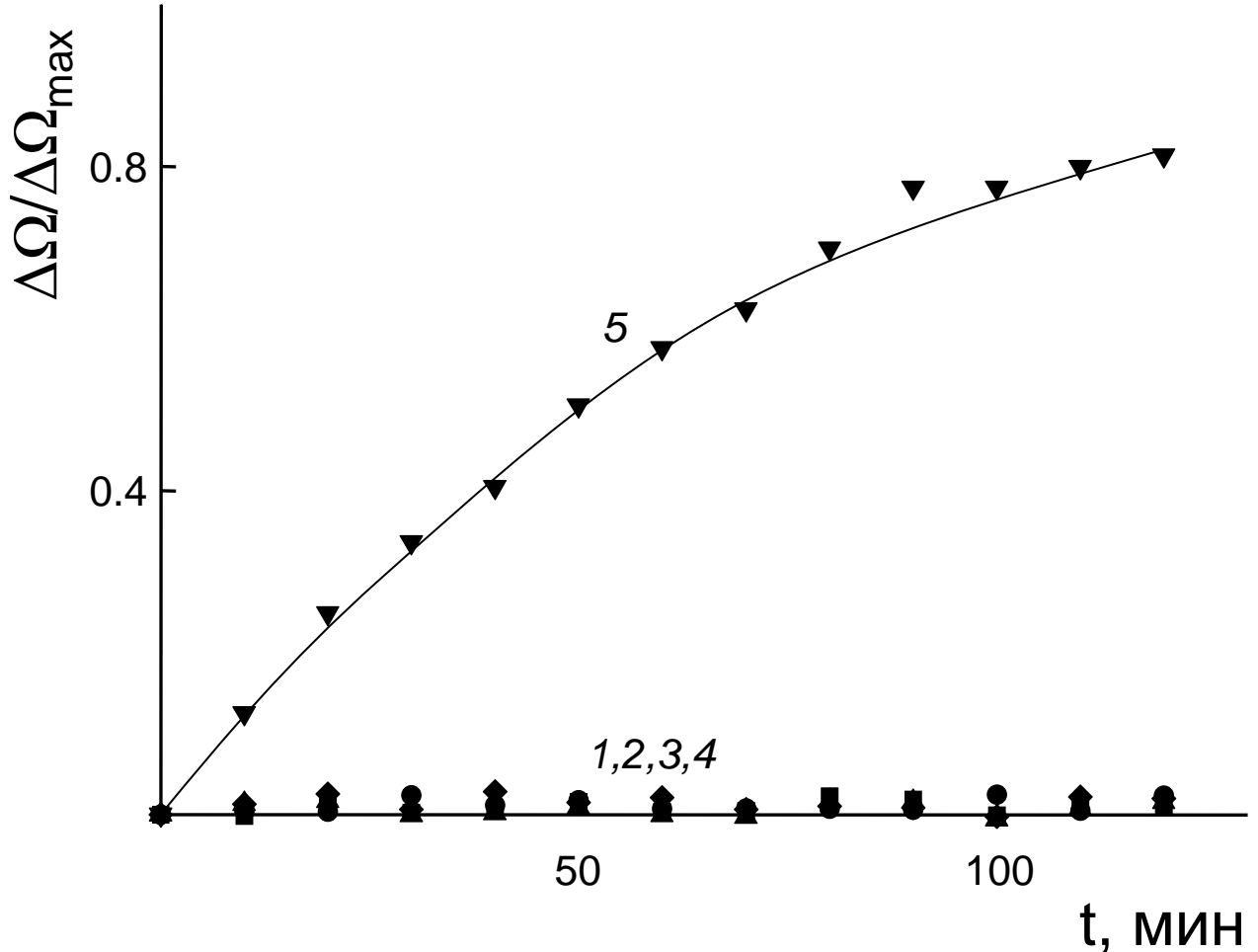


Рис. 12. Зависимость относительной электропроводности суспензии СК⁺/липосомы КЛ²⁻/ФХ от времени. $v = 0.05$ (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4), 0.4 (5). Общая концентрация липидов 1 мг/мл ; $[\text{КЛ}^{2-}]/[\text{СК}^+] = 2/3$; 10^{-2} М боратный буфер рН 9. 2; 20°C .

Для сравнения мы добавили ФХ/КЛ²⁻ липосомы, заполненные раствором NaCl, к суспензии 100 нм полимерных микросфер **без** привитых поликатионных цепей на поверхности. В этом эксперименте были использованы «традиционные» микросферы с катионными группами на поверхности, полученные на первой стадии описанной выше процедуры получения сферических поликатионных щеток (см. Экспериментальную часть). Добавление липосом с $v = 0.1$ к суспензии таких микросфер сопровождалось уменьшением заряда последних, что указывало на связывание липосом с поверхностью микросфер. Однако параллельно с комплексообразованием мы регистрировали заметное возрастание электропроводности, которое, очевидно, было следствием появления

дефектов в адсорбированных липосомах и вытекания раствора NaCl. Этот результат демонстрирует принципиальное различие в поведении анионных липосом, связанных с двумя типами катионных полимерных микросфер: разрушение липосом при их адсорбции на «жесткой» катионной поверхности «традиционных» полимерных микросфер и сохранение их целостности при адсорбции на поверхности с привитыми катионными цепями. В последнем случае разрушению липосом препятствует гидрофильный слой привитых макромолекул, который предотвращает непосредственный контакт иммобилизованных липосом с твердой поверхностью полистирольного ядра.

Таким образом, можно сформулировать физикохимические свойства комплексов поликатионных щёток с анионными липосомами необходимые для их использования в качестве носителей для доставки лекарственных веществ. С одной стороны, взаимодействия между поликатионными щётками и анионными липосомами должны быть достаточно сильными, чтобы комплексы были устойчивы при физиологических значениях ионной силы. С другой – при их взаимодействии не должно происходить разрушения липосомальной структуры. Для липосом, содержащих в качестве анионного компонента кардиолипин, диапазон доли отрицательно заряженного липида с учетом приведенных выше условий лежит в пределах от 0.1 до 0.3.

Для получения дополнительной информации о морфологии комплексов СК+/липосома был использован метод криогенной трансмиссионной электронной микроскопии (крио-ТЭМ). Этот метод был специально разработан для анализа морфологии «мягких» объектов, в том числе липосом, которые могут существенно менять размер и форму при высушивании образца, что неизбежно в традиционных вариантах электронной микроскопии. На Рис. 13а показана типичная микрофотография поликатионной щетки в водно-солевом буферном растворе; привитые поликатионные цепи видны на этом рисунке без дополнительного контрастирования. Электронная микрофотография липосом (Рис. 13б) подтверждает их моноламеллярную структуру; полученный этим

методом средний размер липосом (50 ± 10 нм) согласуется с приведенными выше данными динамического светорассеяния. Частицы комплекса СК+/липосома изображены на Рис. 13в. Каждая частица состоит из одной поликатионной щётки, окруженной несколькими липосомами. Рисунок ясно показывает сохранение сферической формы липосом (то есть целостности липосом) после их связывания со щетками.

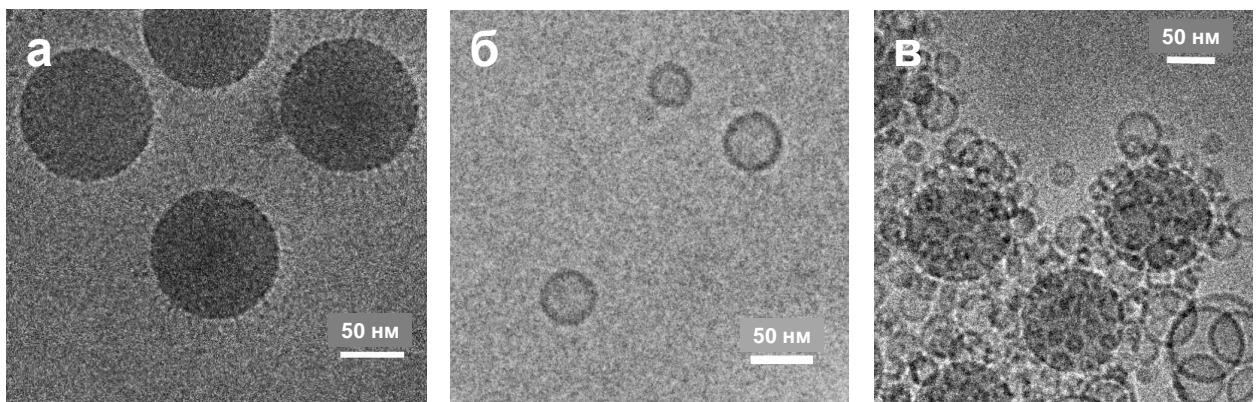


Рис. 13. Крио-ТЭМ изображения СК+ (1), ФХ/КЛ²⁻ липосом (2) и комплекса СК+/липосома (3). Для приготовления образцов использованы 1.5 мг/мл суспензия СК+ (1), 0.1 мг/мл суспензия липосом (2) и смешанная суспензия, содержащая 1.5 мг /мл СК+ и 0.1 мг/мл липосом (3).

4.1.2. Комплексы с участием ФС¹⁻/ФХ липосом.

Ранее было показано, что целостность анионных липосом в комплексе с линейными катионными полимерами определяется – среди прочего – геометрической формой анионного липида (см., например, [136]). Таким образом, главной причиной образования дефектов в мембране ФХ/КЛ²⁻ липосом с $v = 0.4$ в комплексе с СК+, является геометрическая форма анионного липида (усечённый конус, в отличие от цилиндрической формы ФХ). СК+ вызывают в липосомальной мембране латеральную сегрегацию и флип-флоп анионного липида. Это обусловлено электростатическим влиянием положительного заряда щёток и КЛ²⁻ оказывается стянутым в отдельную фазу а, из-за различия в геометрии этого липида и ФХ происходит деформация мембраны на границе фаз КЛ²⁻–ФХ.

Чтобы избежать деформации липосомальной мембраны при взаимодействии липосом с высоким содержанием анионного липида с СК+, в качестве отрицательно

заряженного компонента мы использовали фосфатидилсерин (PC^{1-}). Форма молекулы PC^{1-} напоминает цилиндр с почти равными площадями сечения «головки» и алкильных «хвостов».

Взаимодействие таких липосом с поликатионными щётками ничем не отличается от взаимодействия с SC^+ липосом, содержащих кардиолипиды в качестве анионного компонента. На Рис. 14 представлены зависимости изменения ЭФП от количества добавленных к щёткам липосом. Из рисунка видно, что добавление суспензии липосом, содержащих PC^{1-} , к SC^+ сопровождается уменьшением ЭФП частиц, которая достигает нулевого значения при концентрации отрицательного заряда равного 1×10^{-4} М (для липосом с $v = 0.1$ это соответствует 0.72 мг/мл), что эквивалентно концентрации положительных зарядов в системе. Дальнейшее добавление липосом приводит к перезарядке поверхности комплексов. Увеличение доли анионного липида в липосомах приводит к уменьшению количества липосом требуемого для нейтрализации заряда щёток. Причём количество отрицательно заряженного липида в нейтральном комплексе остаётся эквивалентным количеству положительно заряженных групп щёток. Величина максимального отрицательного значения ЭФП зависит от доли фосфатидилсерина в мембране и растёт по мере увеличения отрицательного заряда липосом. Так для комплексов с липосомами с долей анионного липида 0.1 максимальный отрицательный заряд составляет -0.5 (кривая 1), в то время как для липосом с содержанием фосфатидилсерина 0.4 , 0.5 и 0.54 (кривые 4, 5 и 6) ЭФП максимальное достигает -2.2 .

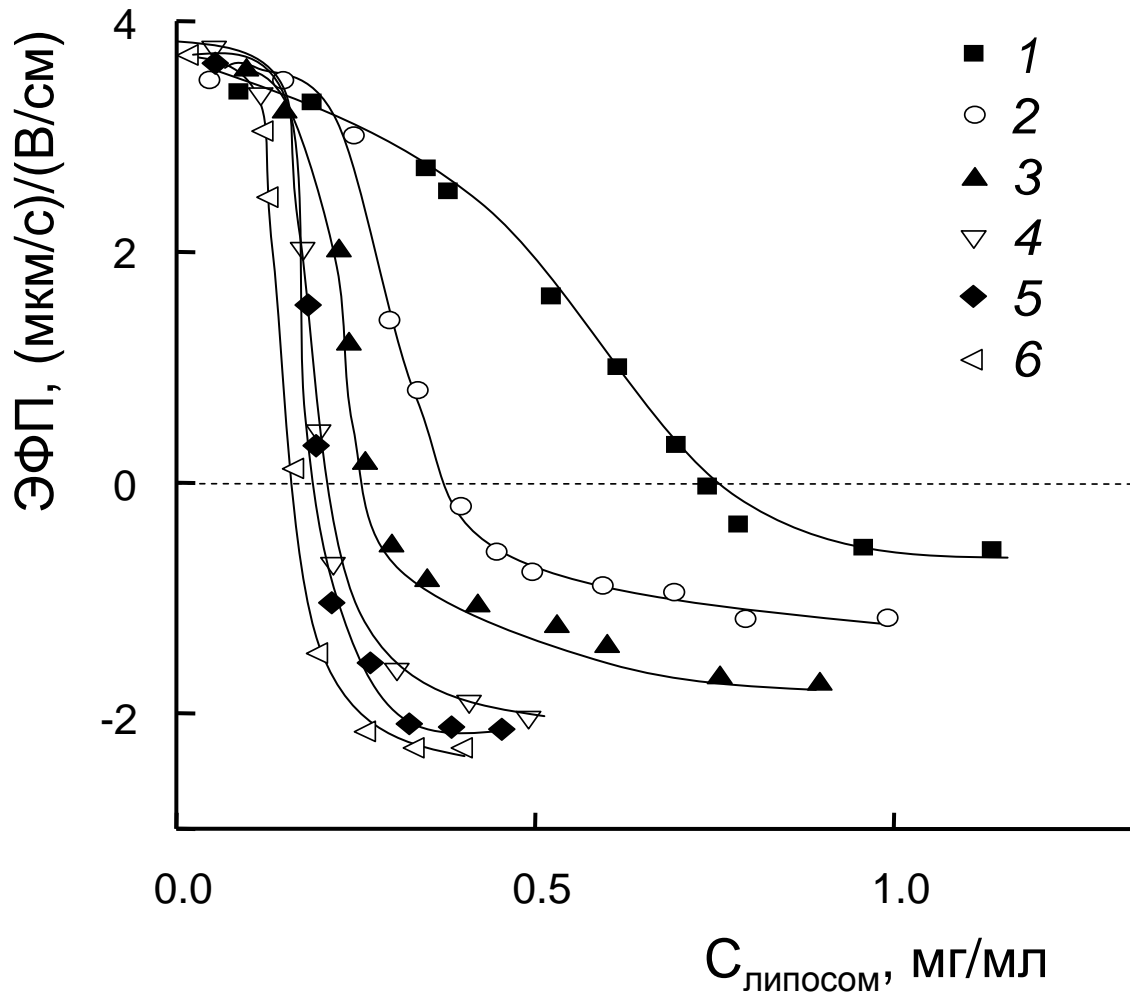


Рис. 14. Зависимость ЭФП частиц комплекса СК+/липосомы ФС¹⁻/ФХ от концентрации липосом. Содержание анионного липида в липосомах $\nu = 0.1$ (1), 0.2 (2), 0.3 (3), 0.4 (4), 0.5 (5), 0.54 (6). [СК+] = 1×10^{-4} осново-моль/л; 10^{-2} М трис буфер рН 7.0; 20 °С.

Параллельные измерения размеров частиц (Рис. 15) показали, что начальное добавление липосом к поликатионным щёткам не приводит к увеличению размеров частиц. По мере приближения заряда частиц к 0 увеличиваются их размеры, что обуславливается агрегацией нейтральных частиц. После достижения максимальных размеров, при перезарядке частиц наблюдается уменьшение их размеров. При двукратном избытке отрицательного заряда размеры частиц достигают своего начального значения.

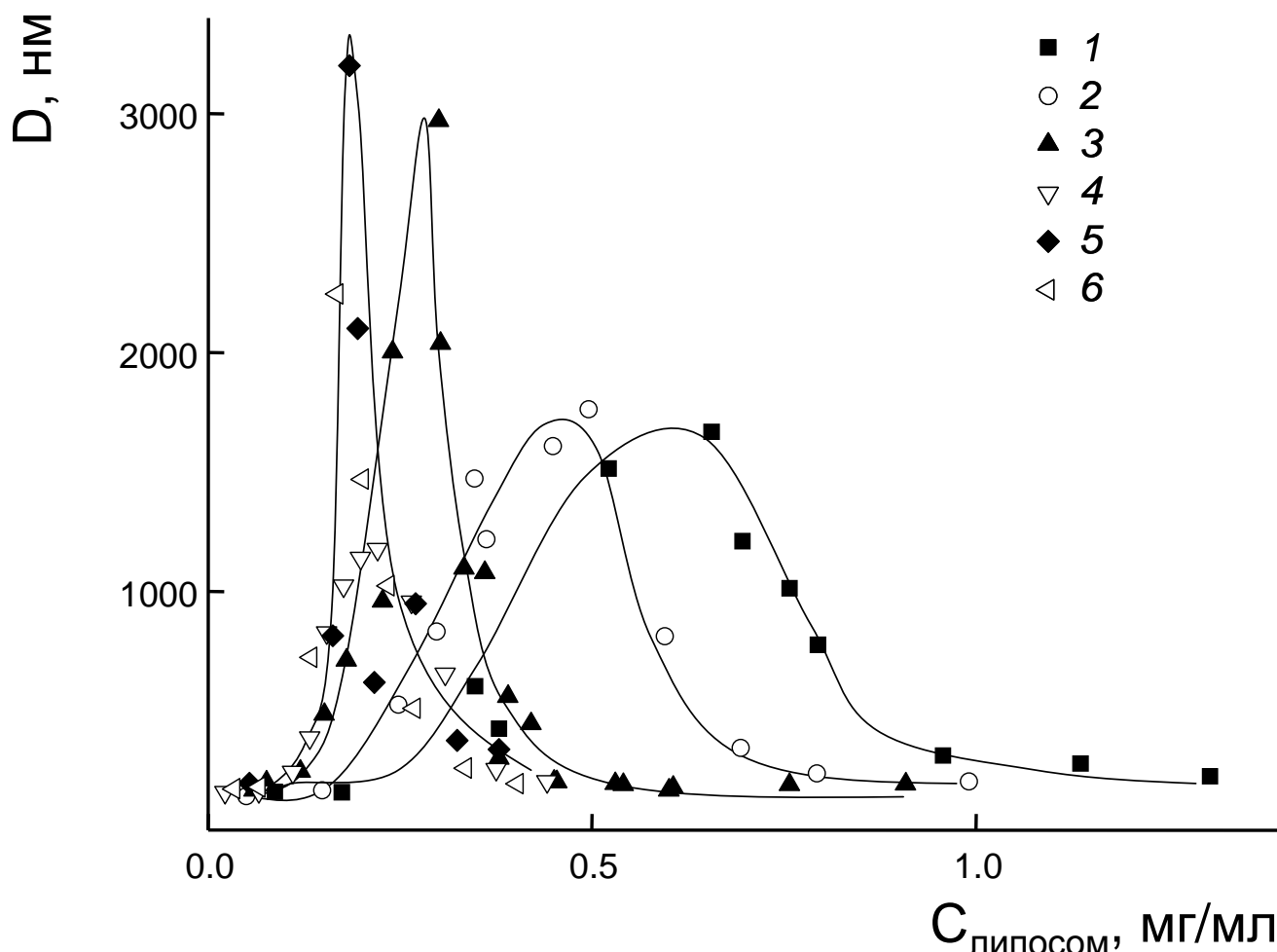


Рис. 15. Зависимость гидродинамического диаметра частиц комплекса СК⁺/липосомы ФС¹/ФХ от концентрации липосом. Содержание анионного липида в липосомах $v = 0.1$ (1), 0.2 (2), 0.3 (3), 0.4 (4), 0.5 (5), 0.54 (6). $[СК^+] = 1 \times 10^{-4}$ осново-моль/л; 10^{-2} трис буфер; рН 7.0; 20 °С.

Для оценки количества адсорбированных на одну щётку липосом был проведён эксперимент с флуоресцентно мечеными липосомами, аналогичный представленному выше для кардиолипиновых липосом (раздел 4.1.1). На Рис. 16 приведена зависимость количества несвязавшихся липосом от количества липосом, добавленных в систему. По точке излома определяли максимально возможное количество липосом связавшихся с щётками. Очевидно, что при концентрациях липосом ниже этой точки, все добавленные липосомы связываются с щётками.

Полученные результаты позволили рассчитать предельное количество липосом, адсорбированных на одной катионной щетке по уравнению 1. Это количество не зависит от природы анионного липида и составляет около 40 липосом с $v = 0.1$ и спадает до 16 при $v = 0.4$.

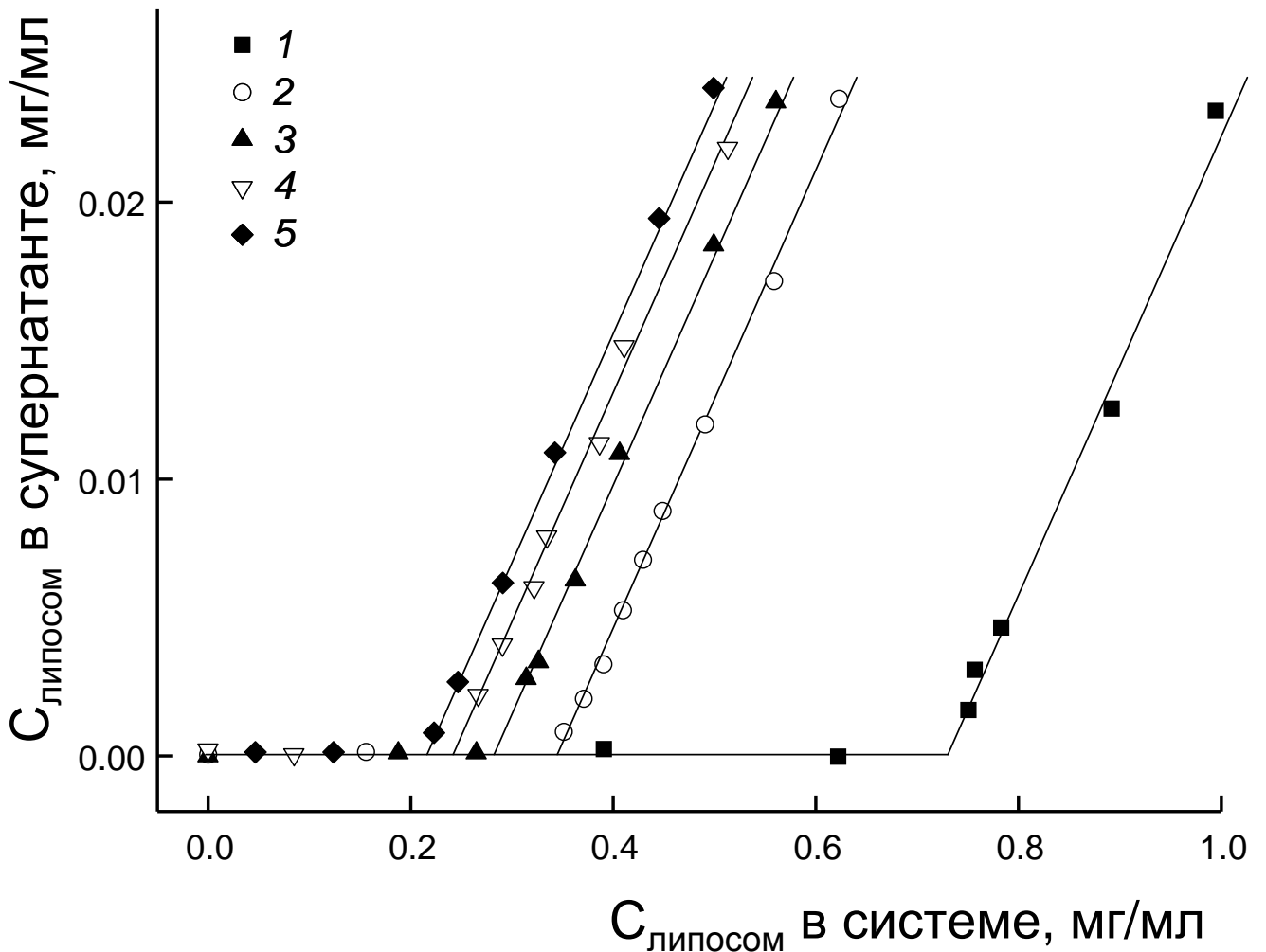


Рис. 16. Зависимость концентрации $\text{ФС}^{1-}/\text{ФХ}$ липосом в надосадочной жидкости от общей концентрации липосом в системе. $\nu = 0.1$ (1), 0.2 (2), 0.3 (3), 0.4 (4), 0.5 (5); $[\text{СК}^+] = 1 \times 10^{-4}$ основ. моль/л; 10^{-2} М трис буфер, рН 7.0; 20 °С.

Влияет ли форма анионного липида на целостность (стабильность) липосом в комплексе с графтированным поликатионом, ковалентно связанным с поверхностью полистирольных латексных частиц? Для ответа на этот вопрос липосомы, заполненные 1 М раствором NaCl, с различным содержанием «симметричного» ФС^{1-} добавляли к суспензии поликатионных щеток. За целостностью липосом следили по вытеканию соли во внешний раствор и увеличению суммарной электропроводности суспензии. Как видно из Рис. 17, соль не вытекала из липосом с $\nu \leq 0.5$ (кривые 1-5); последующее увеличение доли анионного липида приводило к быстрому возрастанию электропроводности (кривая 6), то есть к формированию дефектов в липосомальной мембране.

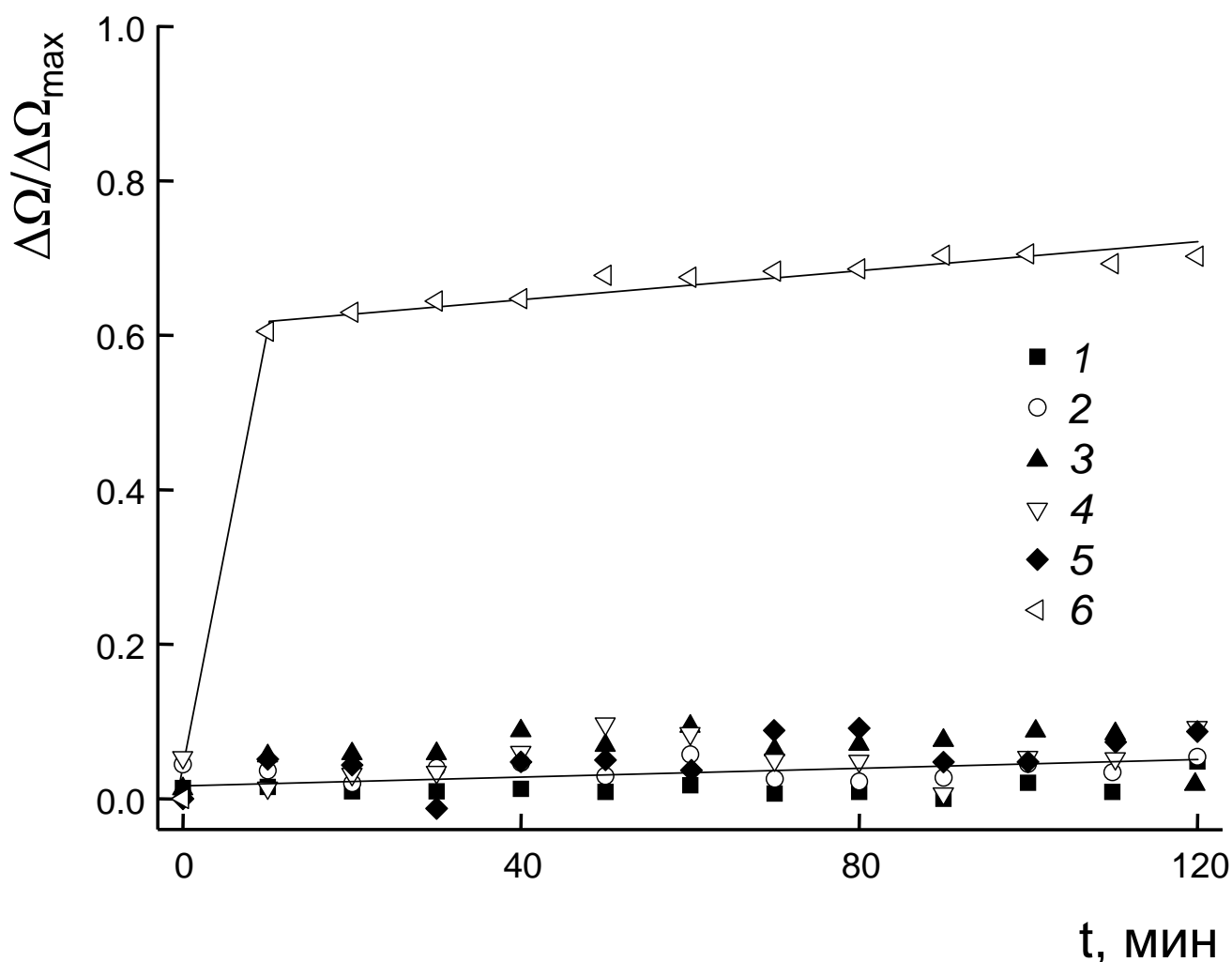


Рис. 17. Зависимость относительной электропроводности суспензии комплекса СК⁺/липосомы ФС¹⁻/ФХ от времени. Содержание анионного липида в липосомах $\nu = 0.1$ (1), 0.2 (2), 0.3 (3), 0.4 (4), 0.5 (5), 0.54 (6) Общая концентрация липидов 1 мг/мл; [СК⁺] $\times 10^{-4}$ осново-моль/л = 1.9 (1), 3.9 (2), 5.9 (3), 7.9 (4), 9.9 (5), 10.1 (6); 10^{-3} М трис буфер, рН 7.0; 20 °С.

Для контроля за обратимостью комплексообразования в системе «ФС¹⁻/ФХ липосомы + СК⁺» использовали метод тушения/возгорания флуоресценции, описанный выше для системы с участием КЛ²⁻-содержащих липосом. Рис. 18 отражает тушение флуоресценции ФИТЦ-меченых ФС¹⁻/ФХ липосом с различным содержанием анионного липида при их связывании с СК⁺. Добавление раствора соли к суспензиям комплексов СК⁺/липосома сопровождалось восстановлением флуоресценции до исходного уровня при условии, что мольная доля ФС¹⁻ в липосомах не превышала 0.5 (Рис. 18, кривые 1-5). Комплексы липосом с бóльшим содержанием ФС¹⁻ не диссоциировали при добавлении соли (кривая 6). Полученные результаты коррелировали с данными кондуктометрии (Рис. 17): формирование дефектов в мембранах адсорбированных липосом делало их связывание со щетками необратимым.

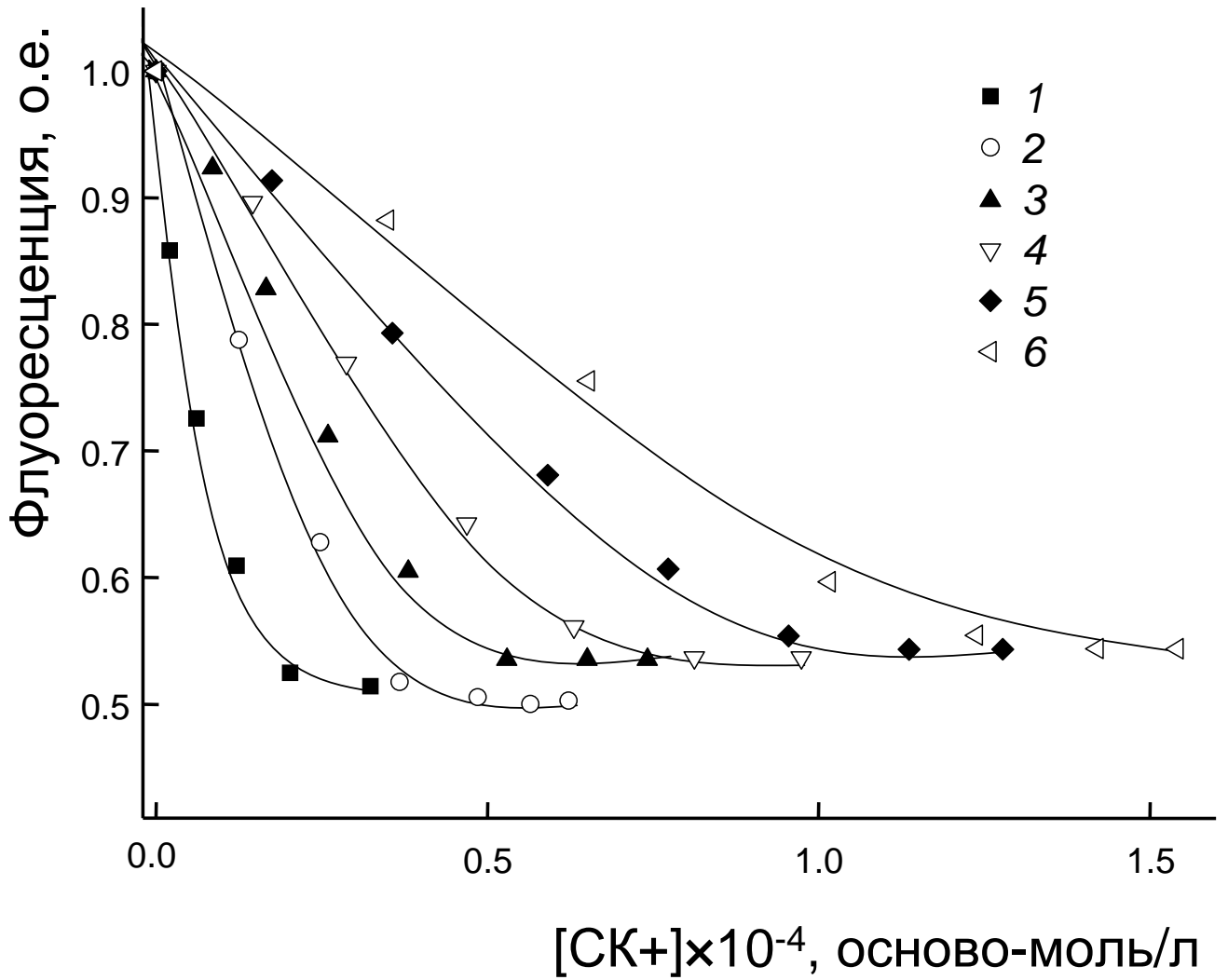


Рис. 18. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции в системе CK^+ /меченые липосомы ΦS^+ / ΦX от концентрации CK^+ . Содержание анионного липида в липосомах $v = 0.1$ (1), 0.2 (2), 0.3 (3), 0.4 (4), 0.5 (5), 0.54 (6). Общая концентрация липидов 1 мг/мл; 10^{-2} М трис буфер, рН 7.0; 20 °С.

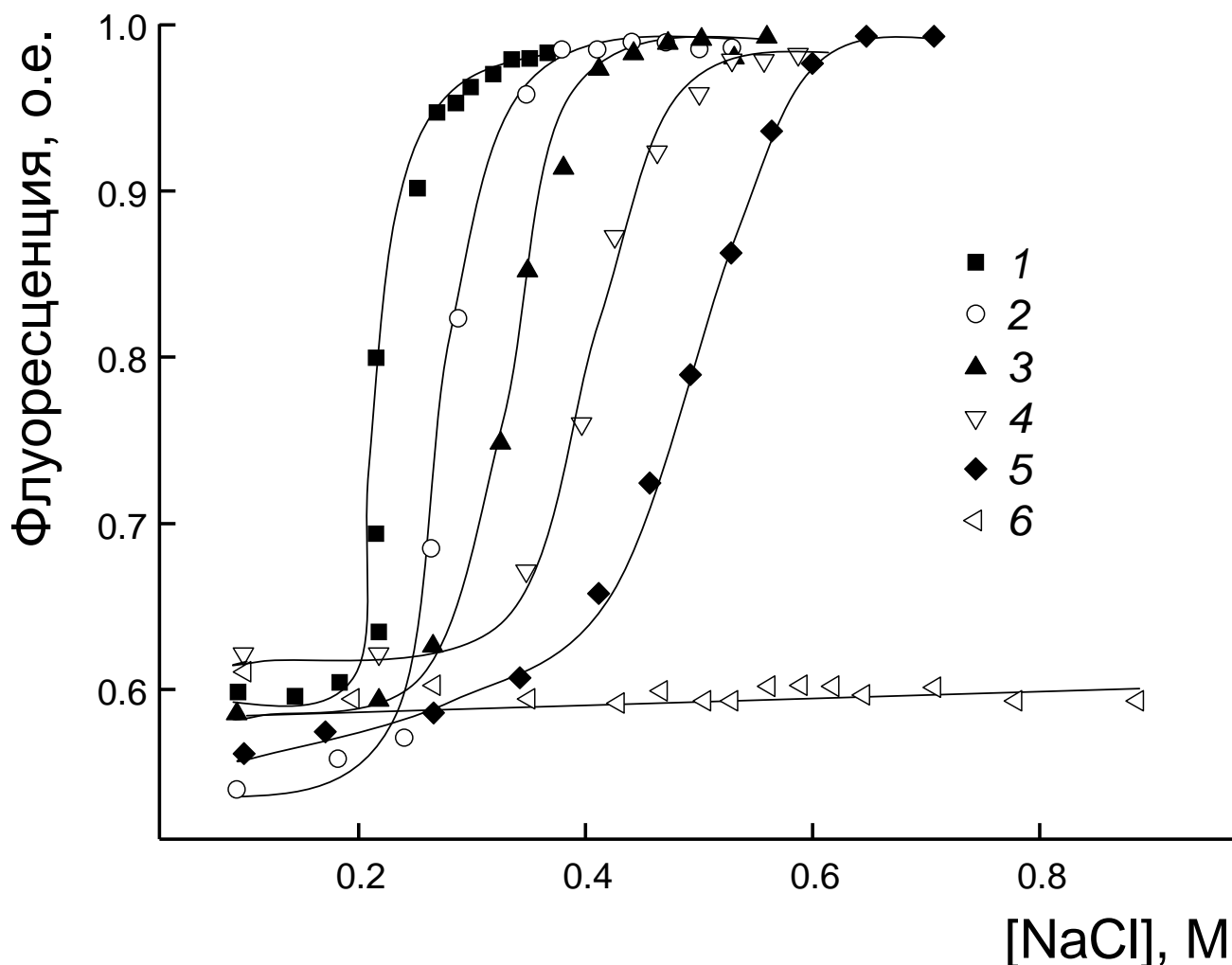


Рис. 19. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции комплекса $СК^+$ /меченые липосомы $ФС^{1-}/ФХ$ от концентрации $NaCl$. Содержание анионного липида в липосомах $\nu = 0.1$ (1), 0.2 (2), 0.3 (3), 0.4 (4), 0.5 (5), 0.54 (6). Общая концентрация липидов 1 мг/мл; 10^{-2} М трис буфер, pH 7.0; 20 °С.

Примечательно, что все полученные комплексы сохраняли устойчивость в физиологическом растворе с $[NaCl] = 0.15$ М (Рис. 19). Адсорбционные эксперименты позволили оценить предельное количество липосом, способных адсорбироваться на одной поликатионной щетке: от 40 для липосом с $\nu = 0.1$ до 13 для липосом с $\nu = 0.5$. Таким образом, замена «несимметричного» $КЛ^{2-}$ на «симметричный» $ФС^{1-}$ позволяет (1)сохранить адсорбционную емкость щеток по анионным липосомам и одновременно (2)расширить интервал составов липосом, формирующих стабильные электростатические комплексы с $СК^+$. Последнее может быть принципиально для создания мультилипосомальных контейнеров с контролируемой скоростью выхода различных лекарств.

4.2. Структурные перестройки в мембранах липосом, адсорбированных на поверхности поликатионных щёток

Из литературы известно, что взаимодействие анионных липосом с линейными катионными полимерами может сопровождаться структурными перестройками в липосомальных мембранах: существенным ускорением трансмембранной миграции липидных молекул (флип-флопом) и фазовым разделением в липосомальной мембране (латеральной сегрегацией липидов). Для контроля за структурными перестройками в мембранах анионных липосом, связанных в комплекс с поликатионными щётками, следили, используя методы лазерного микроэлектрофореза и дифференциальной сканирующей калориметрии.

Первый из этих методов отражает изменение электрофоретической подвижности катионных СК⁺ по мере заполнения их поверхности анионными липосомами, то есть при нейтрализации поверхностного заряда щёток адсорбированными липосомами. На Рис. 14 представлены зависимости ЭФП комплексов для липосом с различной мольной долей анионных ФС¹⁻ «головок». Видно, что во всех случаях образование комплекса сопровождалось уменьшением поверхностного заряда СК⁺, и переходом его в отрицательную область при больших концентрациях липосом. Увеличение доли анионного липида в липосомальной мембране требовало меньшего количества (концентрации) липосом для нейтрализации заряда СК⁺ и одновременно повышало максимальный отрицательный заряд, приобретаемый СК⁺ в избытке липосом (ЭФП_{макс}).

Кривая 1 на Рис. 14 описывает электрофоретическое титрование СК⁺ суспензии раствором ФС¹⁻/ФХ липосом с $\nu = 0.1$. Выше мы показали, что липосомы такого состава количественно связываются с поликатионными щётками. Это означает, что в точке ЭФП=0 положительный заряд щёток численно равен суммарному отрицательному заряду ФС¹⁻ липидов, расположенных на внешних (обращенных к СК⁺ поверхности) монослоях адсорбированных липосом, или в других терминах:

$$[\text{СК}^+] = [\text{ФС}^{1-}]_{\text{внеш, ЭФП=0}} \quad (4)$$

Доля ФС¹⁻ молекул, формирующих электростатические связи с СК⁺, была рассчитана следующим образом:

$$\gamma = [\text{ФС}^{1-}]_{\text{внеш, ЭФП=0}} / [\text{ФС}^{1-}]_{0, \text{ЭФП=0}} = [\text{СК}^+] / [\text{ФС}^{1-}]_{0, \text{ЭФП=0}} \quad (5),$$

где $[\text{ФС}^{1-}]_{0, \text{ЭФП=0}}$ – общая концентрация ФС¹⁻ при ЭФП = 0. Расчет по уравнению 5 дает $\gamma = 0.94 \times 10^{-4} \text{М} / 1.01 \times 10^{-4} \text{М} \approx 1$. Принимая во внимание сохранение целостности

липосом после комплексообразования, полученный результат однозначно указывает на то, что адсорбция сопровождается переходом анионных липидов с внутренней стороны липосомальной мембраны на внешнюю. Для случая $\text{ФС}^{1-}/\text{ФХ}$ липосом с $\nu = 0.1$ мы можем записать:

$$[\text{СК}^+] = [\text{ФС}^{1-}]_{\text{внеш}, \text{ЭФП}=0} = [\text{ФС}^{1-}]_{0, \text{ЭФП}=0} = [\text{Лип}]_{\text{ЭФП}=0} \times \nu \quad \text{или}$$

$$[\text{Лип}]_{\text{ЭФП}=0} = [\text{СК}^+]/\nu \quad (6),$$

где $[\text{Лип}]_{\text{ЭФП}=0}$ – концентрация всех ($\text{ФС}^{1-} + \text{ФХ}$) липидов в растворе при $\text{ЭФП}=0$. Если индуцированный СК^+ флип-флоп ФС^{1-} молекул развивается в липосомах с различным содержанием ФС^{1-} , уравнение 6 должно выполняться для всех исследованных систем (комплексов). Данные Рис. 14, перестроенные в соответствии с уравнением 6, описывались линейной зависимостью во всем интервале $1/\nu$ (Рис. 20). Таким образом, СК^+ индуцировали флип-флоп во всех адсорбированных липосомах.

При низком содержании ФС^{1-} индуцированный СК^+ флип-флоп не оказывает влияния на целостность липосом, поскольку миграция ФС^{1-} с внутренней стороны мембраны на внешнюю компенсируется переходом равного количества нейтральных ФХ молекул в противоположном направлении: с внешней стороны мембраны на внутреннюю. Предельное содержание ФС^{1-} , при котором адсорбированные липосомы сохраняют свою целостность, составляет 0.5. При повышении доли анионного липида до 0.54 его переход на внешнюю сторону мембраны уже не может быть компенсирован синхронным перемещением нейтрального липида: в бислое появляются дефекты, что регистрируется кондуктометрически (Рис. 17). Геометрическая комплементарность анионного и нейтрального липидов оказывает существенное влияние на стабильность адсорбированных липосом. Липосомы, в которых КЛ^{2-} , имеющий форму усеченного конуса, распределен среди цилиндрического ФХ , разрушаются при 0.3 содержании КЛ^{2-} . Мембрана, содержащая смесь цилиндрического ФС^{1-} и цилиндрического ФХ , сохраняет целостность вплоть до 0.5 содержания ФС^{1-} .

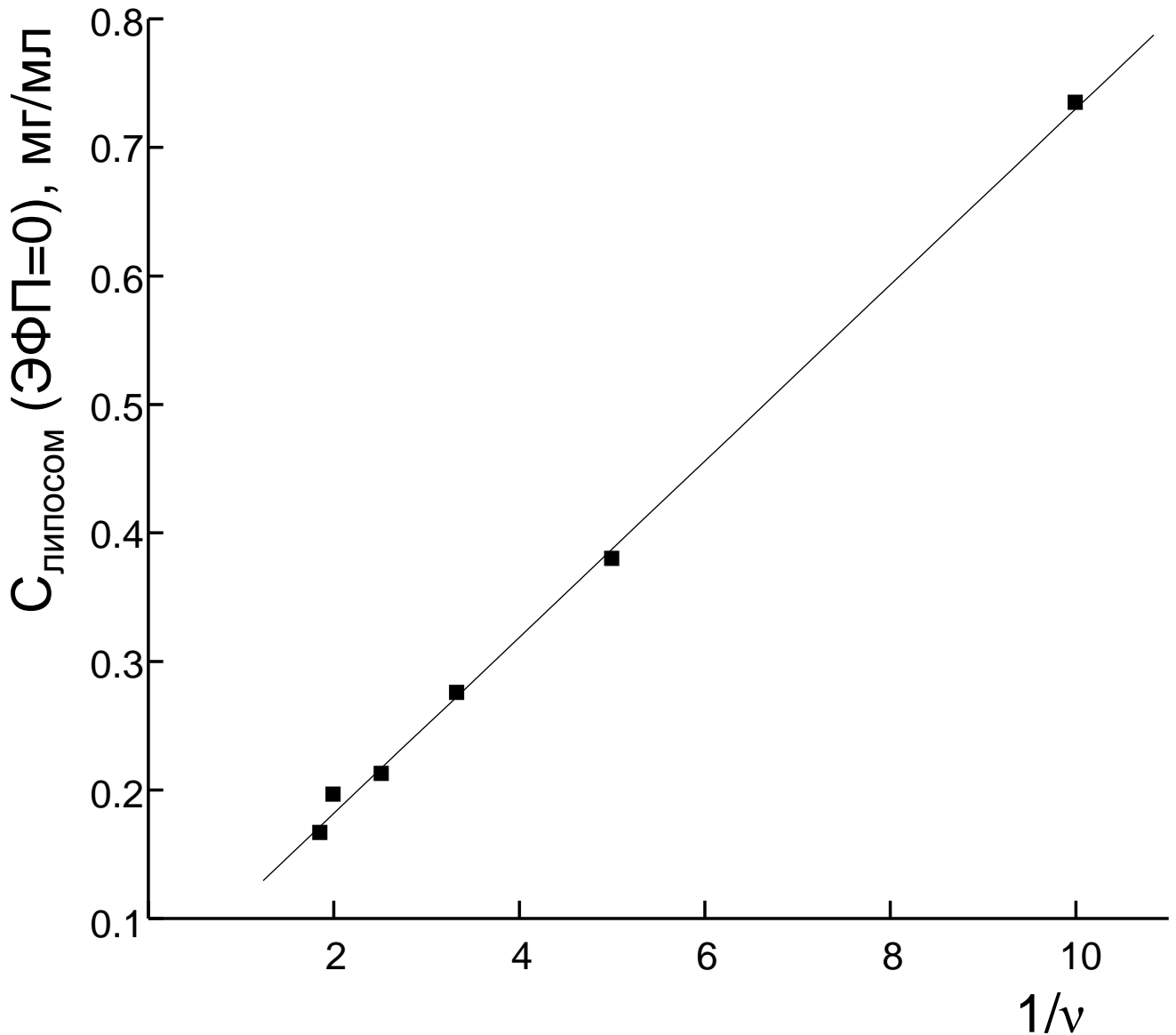


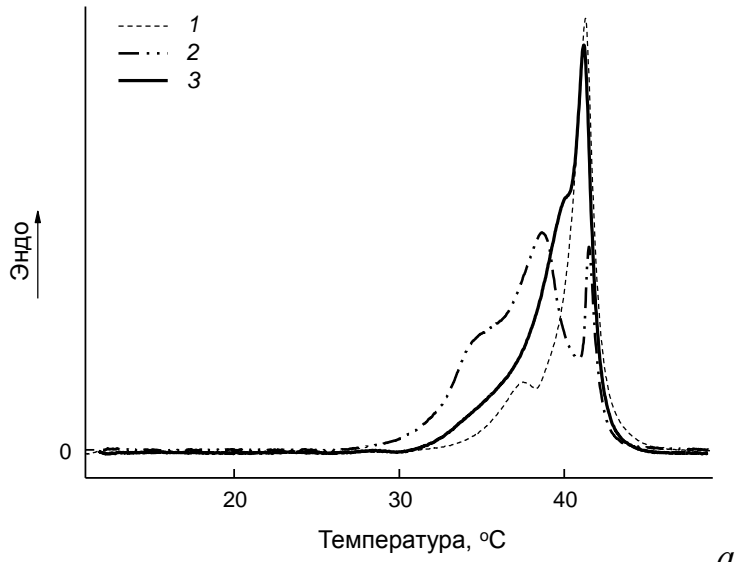
Рис. 20. Зависимость концентрации липосом в комплексе с ЭФП=0 от $1/v$. $[СК^+] = 1 \times 10^{-4} M, 10^{-2} M$ трис буфер, рН 7; 20 °С.

Как анионные $ФС^{1-}$ молекулы распределены в мембране $ФС^{1-}/ФХ$ липосом после их адсорбции на поверхности поликатионных щеток? Для ответа на этот вопрос мы использовали второй из упомянутых выше методов: дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК). С его помощью можно анализировать фазовые переходы в липидном бислое, что в свою очередь позволяет следить за микрофазовым разделением в мембране адсорбированных липосом. Липидный бислой характеризуется температурой фазового перехода (температурой плавления) T_f . Ниже температуры T_f липидный бислой находится в состоянии геля с резко ограниченной подвижностью липидных молекул (“твердые” липосомы). При температуре выше T_f мембрана переходит в жидкокристаллическое состояние, и подвижность липидов в ней

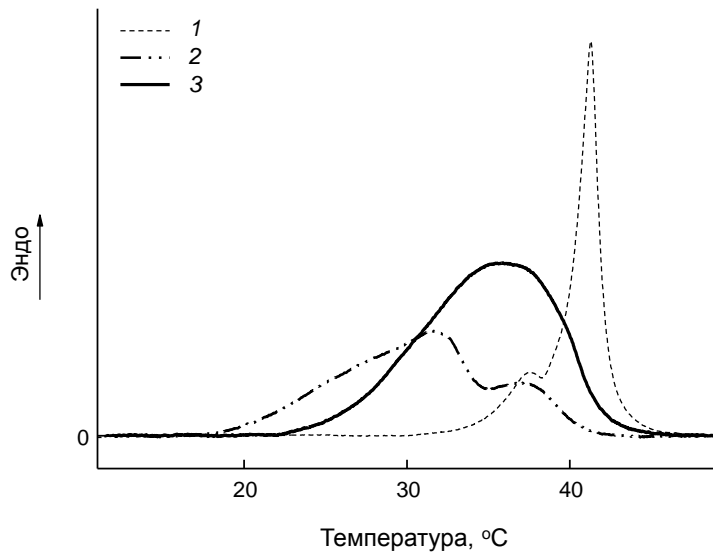
значительно возрастает (“жидкие” липосомы). В наших экспериментах природный ФХ, представляющий собой смесь липидов с различными температурами плавления, был заменен на синтетический аналог, дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), с температурой плавления 41 °С. Калориметрическая кривая, отражающая плавление липосом, сформированных из нейтрального ДПФХ, представлена на Рис. 21а (кривая 1) и воспроизведена на Рис. 21б (кривая 1) и Рис. 21в (кривая 1).

Калориметрическая кривая смешанных ФС^{-1} /ДПФХ липосом с $v = 0.1$ (Рис. 21а, кривая 2) характеризовалась широким фазовым переходом с пиком при 39 °С и плечом при 35 °С, которые отвечали плавлению двух смешанных ФС^{-1} /ДПФХ микрофаз с различным соотношением компонентов. В дополнение к этому на кривой был еще один пик при 41 °С, который указывал на присутствие в мембране доменов, состоявших только из молекул электронейтрального ДПФХ.

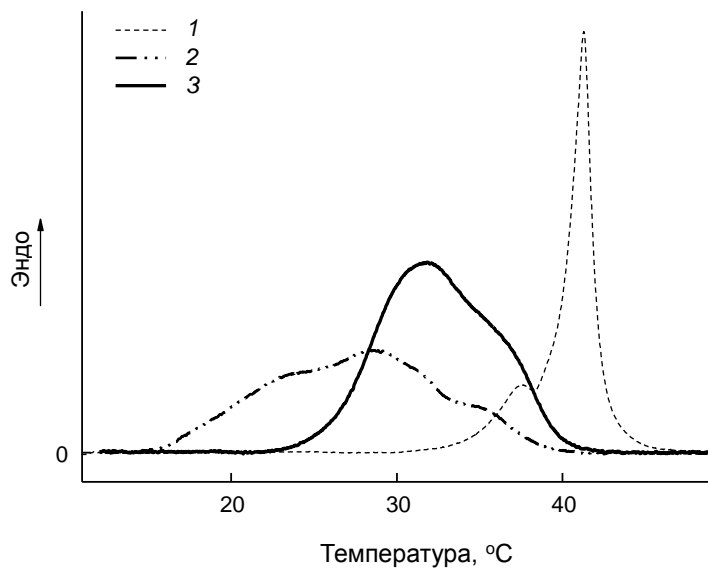
Комплексы СК+/липосома для калориметрических исследований готовили следующим образом. Суспензии липосом и СК+ предварительно прогревали выше температуры фазового перехода бислоя и смешивали, после чего полученную смесь охлаждали до комнатной температуры. Добавление СК+ к суспензии липосом с $v = 0,1$ делало пик фазового перехода более узким с максимумом при 41 °С (Рис. 21а, кривая 3), который отражал образование ДПФХ доменов, освобожденных от анионного ФС^{-1} в результате связывания последнего в электростатический комплекс с СК+. Плечо при 40 °С отвечало доменам ДПФХ с незначительной примесью ФС^{-1} . Что касается комплекса липосома/СК+, его фазовый переход лежал в области температур ниже 5°С, за пределами возможностей использованного микрокалориметра.



a



б



в

Рис. 21. Калориметрические кривые ДПФХ липосом (1), ДПФХ/ FC^{1-} липосом (2), и комплекса с СК^+ . $\nu = 0.1$ (а), 0.3 (б) и 0.5 (в); 10^{-2} М трис буфер, рН 7.0.

Наконец, доля ΦC^{-1} в липосомальной мембране была увеличена до $\nu = 0.5$, что соответствовало предельному содержанию ΦC^{-1} , при котором липосомы все еще сохраняли свою целостность после адсорбции. Широкий фазовый переход в таких липосомах (Рис. 21в, кривая 2) указывал на образование доменов с различным соотношением обоих липидов. Последующее добавление СК^+ к суспензии липосом не приводило к появлению 41°C пика на калориметрической кривой и, следовательно, не вызывало разделения мембраны на две микрофазы: чистого ДПФХ и ΦC^{-1} , связанного в комплекс с катионными группами СК^+ . В адсорбированных липосомах с $\nu = 0.5$ (так же, как и в случае липосом с $\nu = 0.3$) нейтральный ДПФХ формировал смешанные домены с анионным липидом.

Строение мембраны адсорбированных липосом представлено на Рис. 22. При невысоком содержании ΦC^{-1} большая часть ΦC^{-1} молекул сосредоточена в области, непосредственно примыкающей к поверхности СК^+ . Лишь немногие молекулы ΦC^{-1} остаются на противоположной (внешней) стороне адсорбированных липосом, обращенной в буферный раствор (Рис. 22а); именно эти немногочисленные молекулы ΦC^{-1} придают комплексу невысокий отрицательный заряд, регистрируемый методом микроэлектрофореза (Рис. 14, кривая 1). Увеличение доли анионного липида до $\nu = 0.3$ и далее до $\nu = 0.5$ приводит к последовательному увеличению количества молекул ΦC^{-1} на внешней стороне адсорбированных липосом (Рис. 22б) и, как следствие, к прогрессивному возрастанию отрицательного заряда комплекса (Рис. 14, кривые 2-5).

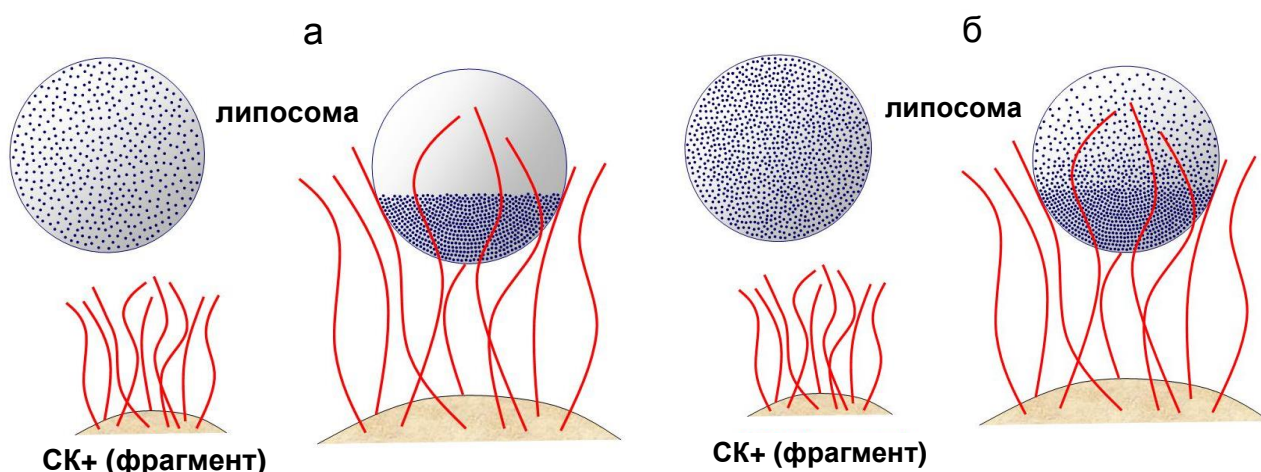


Рис. 22. Схематическое представление липосом с низким (а) и высоким (б) содержанием анионного липида до (левые части рисунков а и б) и после (правые части рисунков а и б) связывания с СК^+ . Низкое содержание липида соответствует $\nu = 0.1$, высокое содержание липида $\nu = 0.3$.

4.3. Комплексы, содержащие липосомы с различными наполнителями.

Сказанное выше относится к комплексам, полученным путем адсорбции на поверхности щеток липосом, заполненных водорастворимой солью (NaCl). Однако описанный прием позволяет формировать мультилипосомальные контейнеры, содержащие липосомы с различными наполнителями. В этом случае адсорбируемая смесь может быть приготовлена из липосом одинакового липидного состава, но содержащих различные – гидрофильные (водорастворимые) и/или гидрофобные (мембранорастворимые) – инкапсулированные вещества. Такие вещества не будут вносить вклад в суммарный отрицательный заряд липосом и поэтому не будут влиять на способность липосом связываться с положительно заряженными сферическими щетками. Можно ожидать, что соотношение липосом в адсорбированном слое не будет отличаться от их соотношения в липосомальной смеси до адсорбции.

Для проверки этой гипотезы были приготовлены три типа ФС¹/ФХ ($v = 0.1$) липосом. Первые были заполнены водным раствором 7-гидроксифеноксазона (лакмуса) (Л_{лак}); в мембрану вторых был встроен гидрофобный краситель 1,1-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндо-карбоцианин перхлорат (ДИЛ) (Л_{дил}); третьи содержали дипальмитоил-фосфатидилэтаноламин, ковалентно меченый карбоксифлуоресцеином (ДПФЭ-КФ) (Л_{кф}). Вещества, различными способами включенные в состав липосом, подбирались таким образом, чтобы при дальнейшем исследовании смеси всех трех видов липосом и их комплексов с поликатионными щетками методом спектрофотометрии пики были разрешимы. Как видно из Рис. 23, липосомы содержали разные типы наполнителей: (1) гидрофильный, (2) гидрофобный и (3) гидрофильный с гидрофобным якорем.

Суспензии трех типов липосом смешивали в разных весовых соотношениях $Q_{исх}=(L_{лак})_{исх}/(L_{ДИЛ})_{исх}/(L_{КФ})_{исх}$, и полученные смеси добавляли к суспензии СК+ с таким расчетом, чтобы суммарная концентрация липосом вдвое превышала ту, которая обеспечивала насыщение поверхности щеток. После отделения комплексов путем центрифугирования были получены спектры супернатантов, содержащих неадсорбировавшиеся липосомы. Липосомы, заполненные раствором лакмуса, детектировали при 586 нм, липосомы со встроенным ДИЛ при 551 нм и липосомы с ДПФЭ-КФ при 498 нм. Сравнение спектров суспензий липосом до добавления щеток и после отделения комплексов позволило количественно оценить соотношение связавшихся с поликатионными щетками липосом.

На Рис. 24 представлены спектры для растворов индивидуальных липосом, а также спектры для смеси трех растворов, где липосомы были взяты в различных соотношениях до и после адсорбции на СК+.

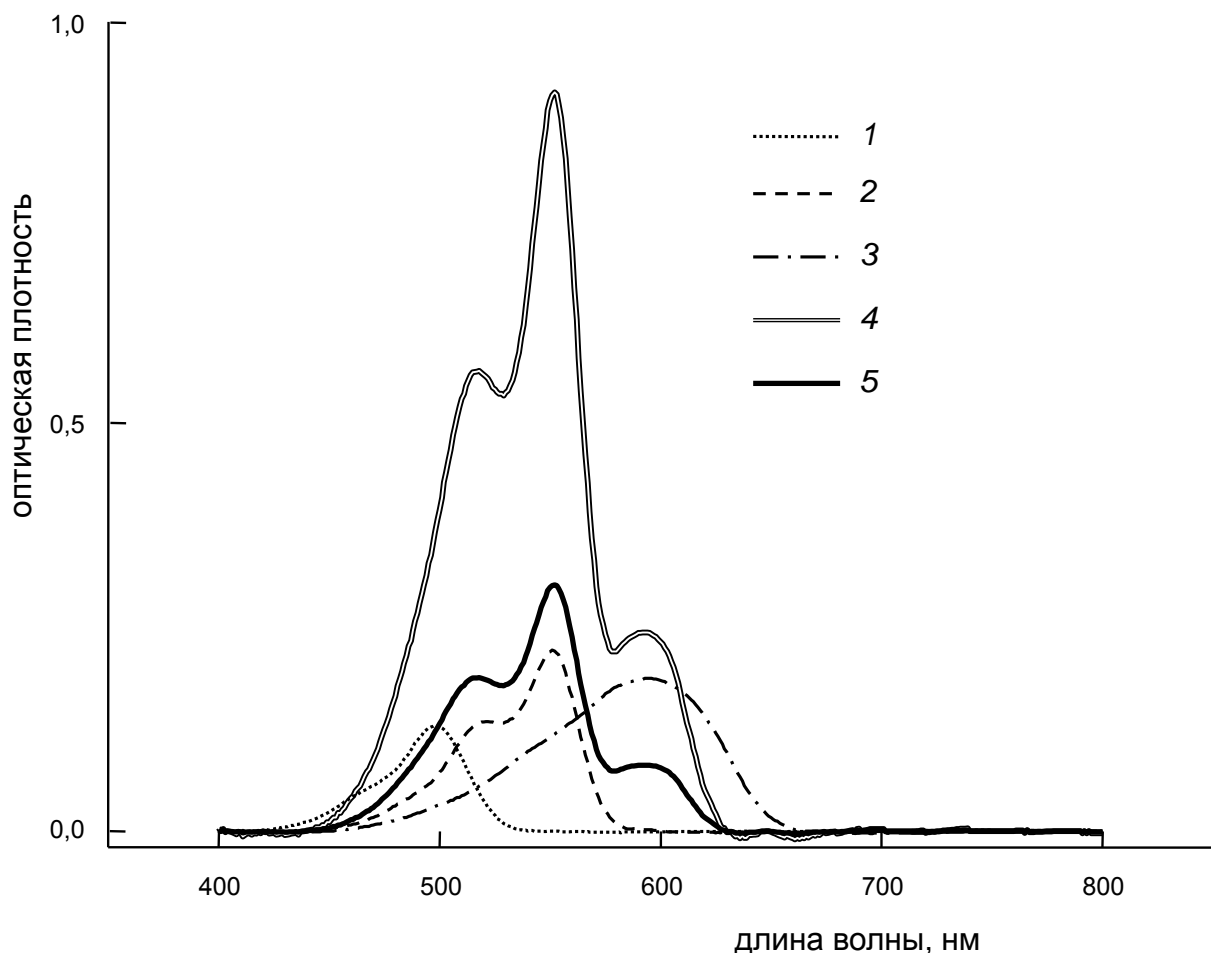


Рис. 24. Спектры поглощения липосом, меченных карбоксифлуоресцеином (1), меченных ДИЛ (2), меченных лакмусом (3), смесь трех типов липосом (в соотношении КФ:ДИЛ:Лакмус = 1:1:0.66) до комплексообразования с СК+ (4) и в супернатанте после отделения комплекса на центрифуге (5).

Полученные результаты пересчитывали в концентрации связавшихся со щетками липосом и представляли в виде весового соотношения $Q_{\text{комп}} = (L_{\text{лак}})_{\text{комп}} / (L_{\text{ДИЛ}})_{\text{комп}} / (L_{\text{КФ}})_{\text{комп}}$. Как видно из данных **Таблицы 1**, $Q_{\text{исх}} = Q_{\text{комп}}$ для всех исследованных смесей. Иными словами, соотношение липосом в адсорбционном слое всегда совпадало с их соотношением в исходной смеси. Описанная методика является хорошей иллюстрацией предлагаемого нами простого способа получения мультилипосомальных контейнеров с контролируемым содержанием инкапсулированных веществ.

Таблица 1. Связывание СК+ со смесями липосом.

	Исходная смесь КФ:ДИЛ:Лакмус	Исходная смесь КФ:ДИЛ:Лакмус
1	1:1:0.66	1:1.15:0.6
2	2:1:0	1.85:1:0
3	1:1.5:0.1	1:1.4:0.16

4.4. Комплексы поликатионных щеток с рН-чувствительными липосомами.

Для того чтобы "открыть" липосомальные контейнеры и высвободить биологически активное содержимое не случайным образом, а при попадании их в слабокислую среду характерную для воспаленных тканей и опухолей был использован следующий подход. В мембрану анионных липосом на стадии их приготовления было встроено липидоподобное амфифильное соединение – алкилированное производное *транс*-3,4-дигидроксипиперидина (ДОП) (Рис. 25). Повышение кислотности среды и протонирование атома азота сопровождается образованием внутримолекулярной водородной связи и изменением конформации ДОП-фрагментов и пространственной ориентации алкильных цепей. В липосомах со встроенным ДОП-липидом такой конформационный переход приводит к нарушению упаковки гидрофобной части бислоя и высвобождению содержимого липосом в окружающую среду. Используемые в наших экспериментах рН-чувствительные липосомы содержали три компонента (в мольных долях): анионный ФС^{1-} (0.1), цвиттер-ионный ФХ (0.6) и ДОП-липид (0.3). Поведение рН-чувствительных липосом сравнивали с поведением традиционных липосом $\text{ФС}^{1-}/\text{ФХ}$ ($v = 0.1$).

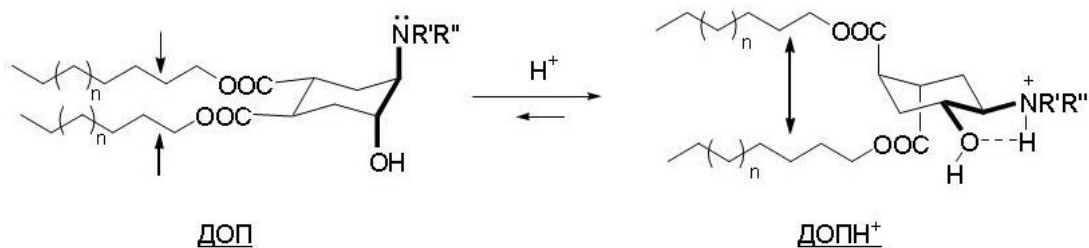


Рис. 25. Конформационный переход в ДОП-липиде.

На Рис. 26а приведена зависимость ЭФП катионных щеток от концентрации добавленных тройных рН-чувствительных липосом в буферном растворе с рН 7 (кривая 1). Эта кривая полностью совпадает с ЭФП зависимостью катионных щеток в присутствии бинарных $\text{ФС}^{1-}/\text{ФХ}$ липосом с $\nu = 0.1$, не содержащих ДОП-липида; кривая 2 для бинарных липосом воспроизведена с Рис. 14 (кривая 1). Такой профиль кривой электрофоретического титрования для рН-чувствительных липосом отражает их адсорбцию на поверхности катионных щеток при рН 7 и указывает на то, что движущей силой адсорбции является образование солевых связей между анионными группами ФС^{1-} и катионными группами СК^+ . Третичные аминогруппы ДОП-липида при этом значении рН находятся в непротонированной (незаряженной) форме и поэтому не вносят вклад в электростатическую адсорбцию $\text{ФС}^{1-}/\text{ФХ}$ липосом.

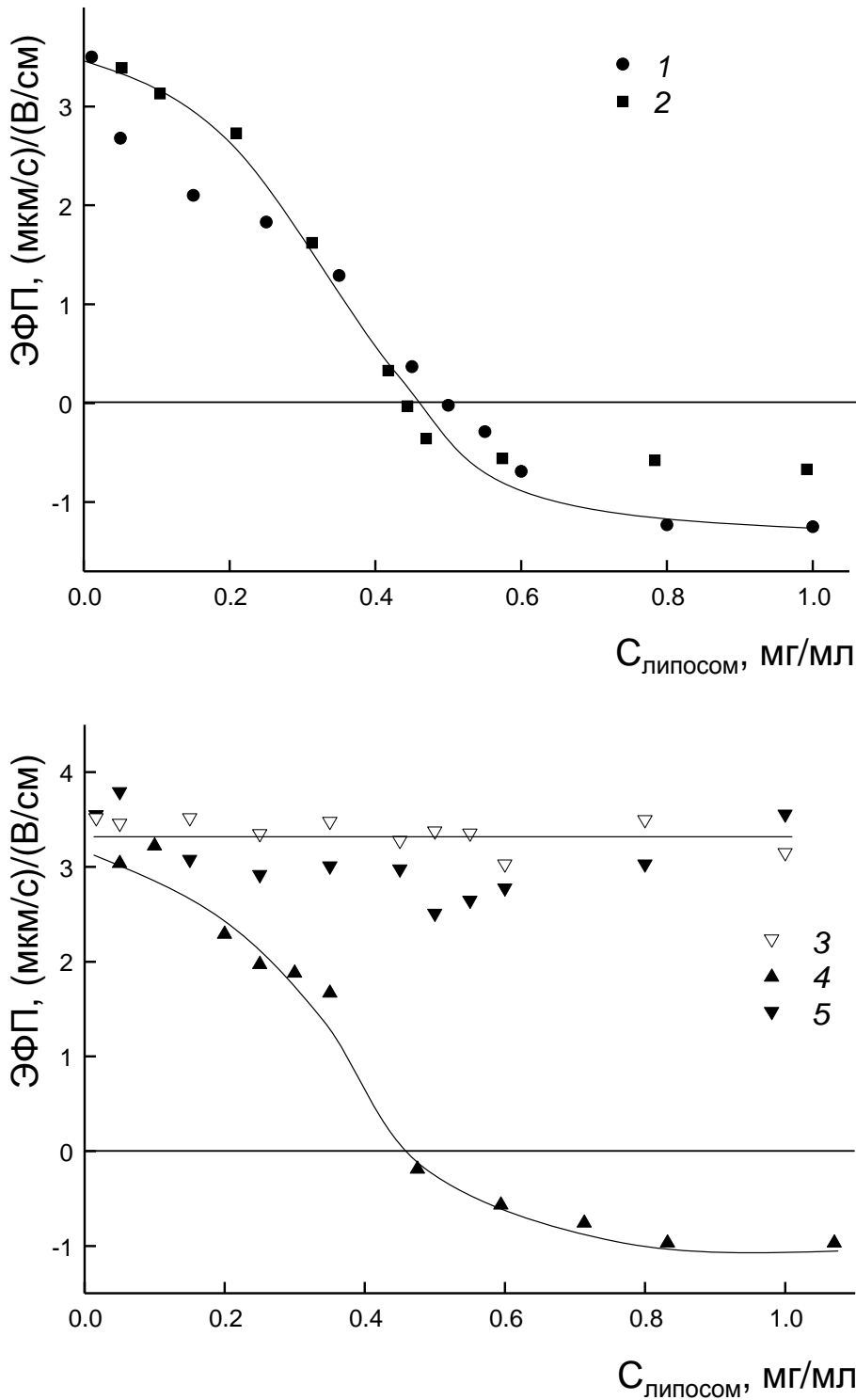


Рис. 26. Зависимость ЭФП частиц СК+ от концентрации липосом. FC¹⁻/FC/ДОП липосомы: рН 7 (1) и 5 (3); FC¹⁻/FC липосомы: рН 7 (2) и 5 (4); FC¹⁻/FC/ДОП липосомы были адсорбированы на поверхности СК+ при рН 7, после чего раствор был подкислен до рН 5 (5). [СК+] = 1×10⁻⁴ осново-моль/л.

Иная картина наблюдается в растворе с рН 5: ЭФП щеток в присутствии рН-чувствительных липосом описывается горизонтальной прямой 3 (Рис. 26), в то время как соответствующая кривая для бинарных липосом по-прежнему имеет δ-образный вид

(Рис. 26, кривая 4) характерный для системы «бинарные липосомы – СК+» в растворе с рН 7. Эти результаты говорят об отсутствии взаимодействия рН-чувствительных липосом со щетками при рН 5 и адсорбции бинарных анионных липосом на поверхности щеток в этих условиях. Причина такого расхождения в поведении липосом с ДОП-липидом и без него заключается в следующем. Понижение рН раствора сопровождается протонированием аминогрупп ДОП-липида, нейтрализацией положительного заряда FC^{1-} молекул и уменьшением суммарного заряда рН-чувствительных липосом. При рН 5 заряд липосом переходит в положительную область и становится равным $0.78 \text{ (мкм/с)/(В/см)}$. Такие липосомы перестают связываться с положительно заряженными щетками. Что касается бинарных липосом, их отрицательный заряд в основном определяется фосфатными группами FC^{1-} молекул, степень диссоциации которых близка к максимальной при обоих значениях рН. Именно это и определяет одинаковую эффективность связывания бинарных липосом с СК+ при рН 7 и 5.

После этого мы сформировали комплекс катионных щеток и рН-чувствительных липосом при рН 7 и затем закислили внешний раствор до рН 5. Этот эксперимент моделировал ситуацию, когда мультилипосомальный контейнер из кровотока с рН близким к нейтральному попадает в слабокислую среду характерную для воспаленных тканей и опухолей. Сохранится ли комплекс при закислении среды, или положительный заряд, создаваемый протонированными ДОП-липидами, вызовет диссоциацию комплекса?

Зависимость ЭФП комплекса, полученного в растворе с рН 7 и затем доведенного до рН 5, представлена на Рис. 26 (кривая 5). Видимое на рисунке отсутствие изменений ЭФП могло быть следствием двух причин. Комплекс мог сохраняться при закислении раствора, тогда регистрируемый нами положительный заряд отражал протонирование ДОП-липида в составе комплекса либо комплекс диссоциировал в растворе с рН 5, и мы фиксировали положительный заряд поверхности СК+, освобожденной от липосом. Чтобы сделать выбор между этими вариантами, были проведены дополнительные эксперименты по измерению размера частиц в системе методом динамического светорассеяния (Рис. 27).

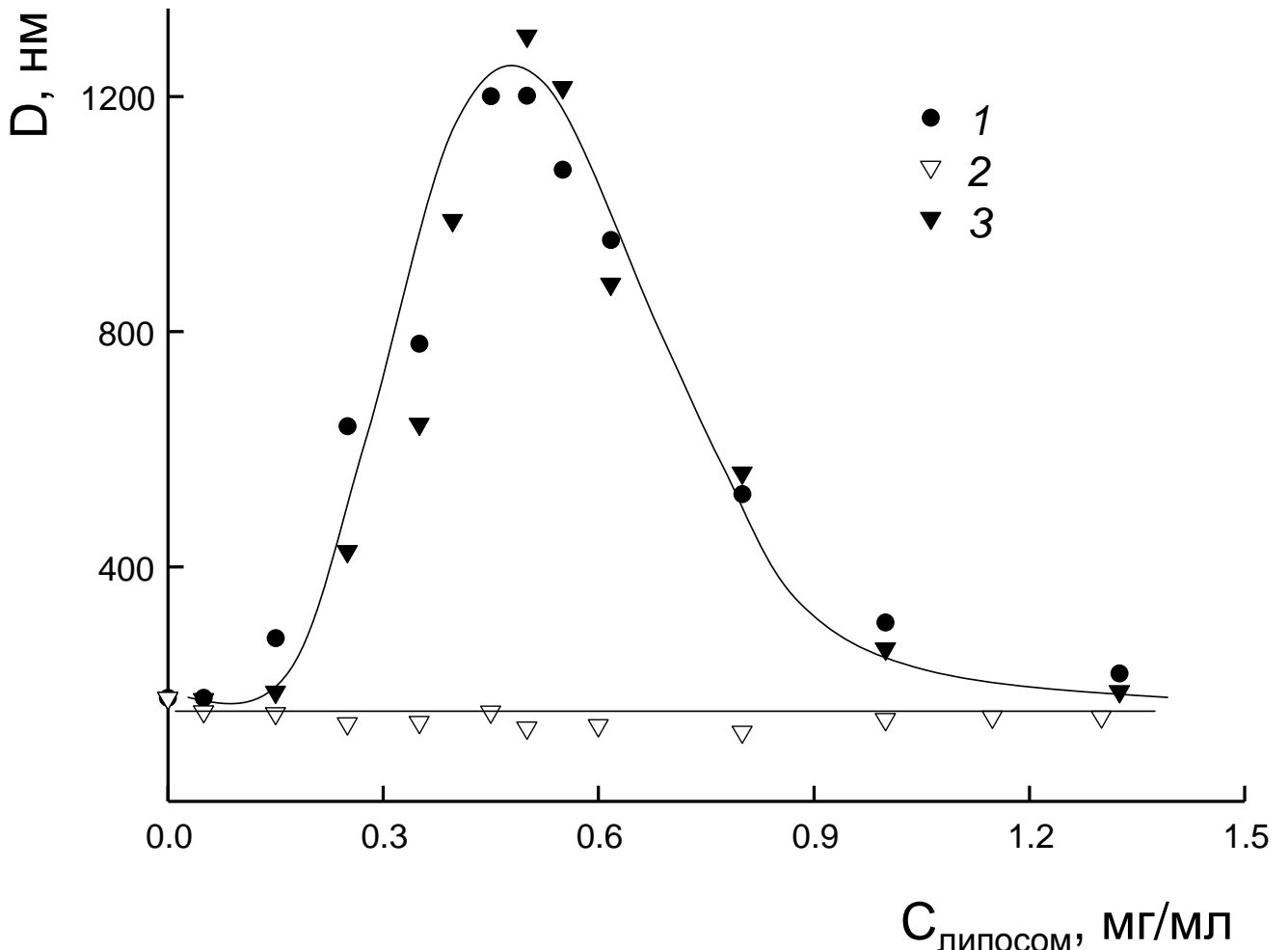


Рис. 27. Зависимость гидродинамического диаметра частиц СК+ от концентрации липосом. Липосомы $\Phi C^1/\Phi X/\text{ДОП}$: рН 7 (1) и 5 (2); $\Phi C^1/\Phi X/\text{ДОП}$ липосомы были адсорбированы на поверхности СК+ при рН 7, после чего раствор был подкислен до рН 5 (3). $[\text{СК}^+] = 1 \times 10^{-4}$ осново-моль/л.

Добавление рН-чувствительных липосом к суспензии СК+ при рН 7 приводило к укрупнению частиц в системе (кривая 1), агрегаты наибольшего размера образовывались при полной нейтрализации заряда щеток зарядом адсорбированных липосом (ср. кривую 1 на Рис. 27 и кривую 1 на Рис. 26). Смешение тех же компонентов при рН 5 не связывалось на размере частиц (Рис. 27, кривая 2), что коррелировало с отсутствием комплексообразования в этих условиях по данным электрофореза (Рис. 26, кривая 4). В «закисленной» системе мы наблюдали формирование агрегатов (Рис. 27, кривая 3), что очевидно указывало на сохранение связывания липосом с поверхностью щеток после смены рН раствора с 7 на 5. Выше мы говорили о том, что связывание анионных липосом с $\nu = 0.1$ с поликатионными щетками сопровождается латеральной сегрегацией липидов, в результате которой бóльшая часть анионных липидных молекул концентрируется в области, непосредственно примыкающей к поверхности щеток (Рис.

22б), при этом цвиттер-ионные молекулы ФХ и непротонированные молекулы ДОП-липидов вытесняются на противоположную (обращенную во внешний раствор) сторону липосомы. Электростатическое взаимодействие анионного домена в липосомальной мембране и катионной поверхности щеток оказывается настолько прочным, что сохраняется и после протонирования ДОП-липидов и появления положительного заряда на внешней поверхности комплекса.

Методом флуоресцентной спектроскопии (описанным в разделе 4.1.1) было показано, что каждая катионная щетка способна в среднем связать около 40 pH-чувствительных липосом.

Способность ФС¹⁻/ФХ/ДОП липосом высвобождать инкапсулированное вещество при закислении раствора была исследована методом кондуктометрии. В эксперименте были использованы липосомы, заполненные 1 М раствором NaCl. Нарушение целостности мембраны сопровождалось вытеканием соли во внешний раствор и увеличением электропроводности суспензии. Полученный результат сравнивали с электропроводностью, полученной в ходе контрольного эксперимента – разрушения липосом в присутствии избытка детергента (Тритона X-100), которую принимали за 100%.

В контрольном эксперименте, когда заполненные солевым раствором липосомы добавляли к суспензии щеток в буфере с pH 7, уровень электропроводности не менялся в течение 2 часов после смешения компонентов. Иными словами, целостность липосом сохранялась после их связывания с СК⁺. Закисление внешнего раствора до pH 5 приводило к быстрому возрастанию электропроводности суспензии: до 50% за первые 15 секунд, с постепенным выходом на максимум (60%) через 40 минут после смешения. Для липосом в отсутствие щеток в растворе с pH 5 наблюдалось гораздо более медленное вытекание соли: 12.5% за первые 10 минут после смены внешнего раствора с pH 7 до pH 5. Полученные результаты показывают, что липосомы со встроенным ДОП-липидом высвобождают инкапсулированное вещество в ответ на изменение pH раствора и скорость выхода вещества из мультилипосомальных комплексов существенно превышает скорость выхода вещества из индивидуальных (не связанных в комплекс) липосом.

Дополнительные эксперименты по вытеканию солевого раствора из липосом, содержащих липид-переключатель, в комплексе с СК⁺ при разных pH, показали, что

скорость вытекания соли зависит от величины рН. Так при понижении величины рН раствора скорость вытекания соли увеличивается.

4.5. Определение цитотоксичности комплексов поликатионных щёток с анионными липосомами.

Для определения цитотоксичности анионных липосом и их комплексов с СК⁺ был использован метод прижизненного окрашивания клеток метилтетразолевым синим. Проникший внутрь клеток краситель под действием окислительно-восстановительных ферментов окислялся до формазана, который выпадал в виде кристаллов. В погибших клетках такого превращения красителя не происходило. Чем активнее происходили процессы жизнедеятельности в клетке, тем большее количество красителя в ней накапливалось. Долю выживших (т.е. продуцирующих формазан) клеток оценивали, измеряя оптическую плотность при длине волны 550 нм, соответствовавшей максимуму поглощения формазана.

На Рис. 28 представлены зависимости доли выживших клеток аденокарциномы молочной железы человека, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, от концентрации добавленного реагента, в качестве которого выступали ФС¹-/ФХ липосомы(1), поликатионные щетки(2), комплексы анионных липосом с поликатионными щётками разного состава: с избытком катионного(3) и анионного(4) компонентов.

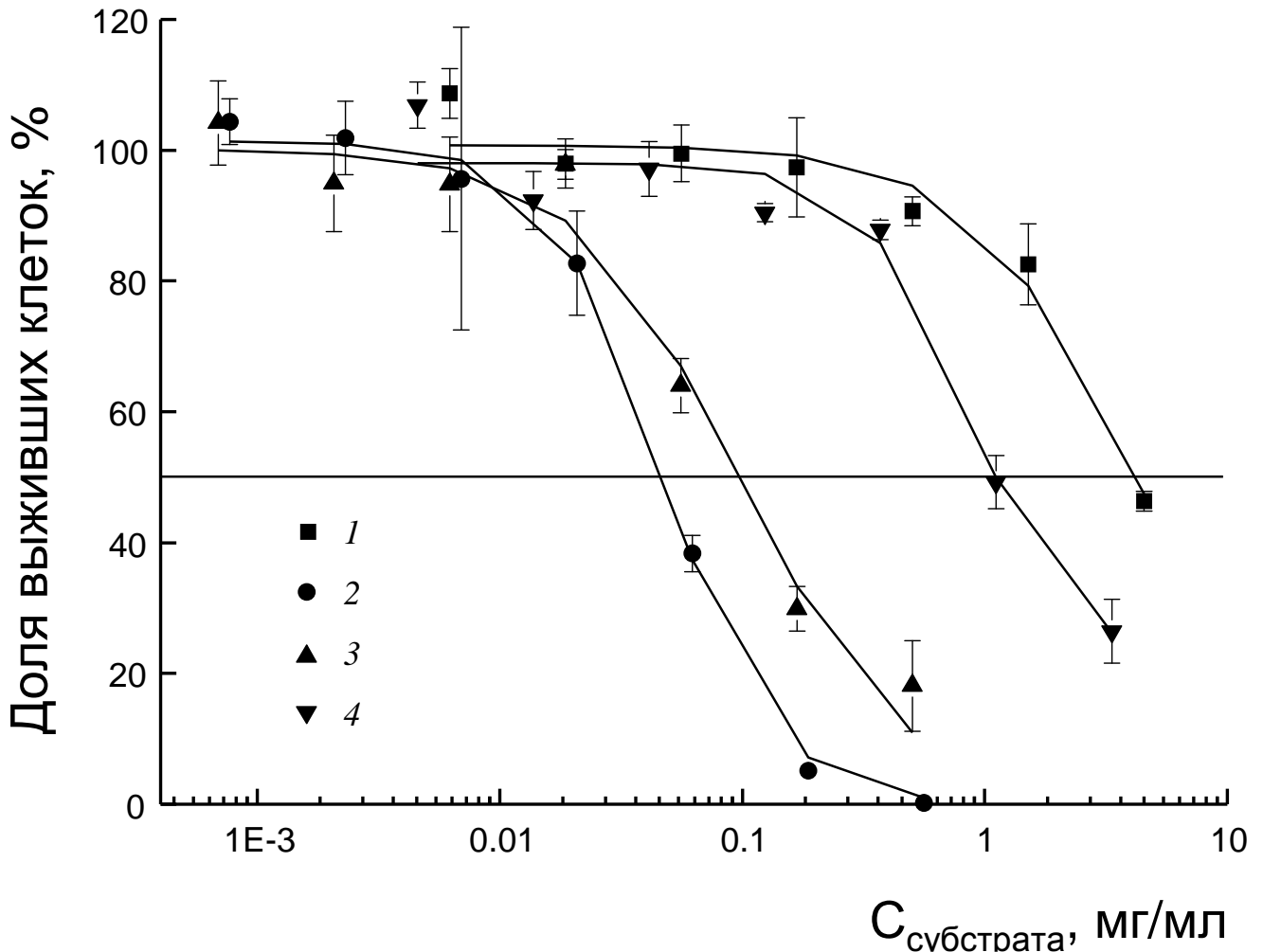


Рис. 28. Зависимость доли выживших клеток в присутствии ΦC^+ /ФХ липосом (1), СК+ (2), комплексов СК+/липосомы в избытке СК+ $[СК+]/[\Phi C^+]=7$ (3), комплексов СК+-липосомы в избытке липосом $[\Phi C^+]/[СК+]=4$ (4).

Как следует из представленных на Рис. 28 данных, концентрации реагентов, при которых они убивали половину клеток (EC_{50}), составляют 4.1 мг/мл для липосом, 0.046 мг/мл для СК+, 0.0966 мг/мл и 1.104 мг/мл для положительно и отрицательно заряженного комплекса соответственно. Таким образом, иммобилизация на поверхности СК+ анионных липосом позволяет понизить их цитотоксичность.

4.6. Комплексы анионных липосом с полипептидными везикулами.

Не смотря на относительно низкую цитотоксичность комплексов СК+/анионные липосомы, их использование в биомедицинских целях вряд ли возможно и данную систему можно использовать исключительно в качестве модельной. Одним из главных минусов СК+ является то, что они небиоразлагаемы. При замене СК+ другим поликатионом аналогичного строения, но являющегося биоразлагаемым мы ожидаем

сохранения основных физикохимических свойств, описанных выше для комплексов СК⁺/анионные липосомы: образование стабильных при физиологических значениях ионной силы комплексов без нарушения липосомальной структуры, с добавлением существенного плюса таким системам – биоразложимости.

В качестве биоразложимого носителя мы использовали везикулы, состоящие из блочного полипептида, гидрофобный блок которого представлен полилейцином, а катионный – полиаргинином. Такие полипептиды образуют везикулы по своему строению похожие на липосомы: катионные блоки полипептидов обращены наружу и внутрь везикул. Везикулы, полученные по методике, описанной в разделе 3.2.3, представляют собой смесь двух фракций различных по размеру везикул.

В экспериментах по изучению свойств комплексов липосом с полипептидными везикулами мы использовали липосомы, содержащие в качестве анионного компонента фосфатидилсерин с $v = 0.1$

Было показано, что замена СК⁺ на полипептидные везикулы существенно не влияет на формирование комплексов с липосомами и физикохимические свойства таких комплексов. Полипептидные везикулы эффективно адсорбируют анионные липосомы (Рис. 29), комплексы являются стабильными при физиологических значениях ионной силы (Рис. 30), и липосомальная структура при адсорбции не нарушается (Рис. 31).

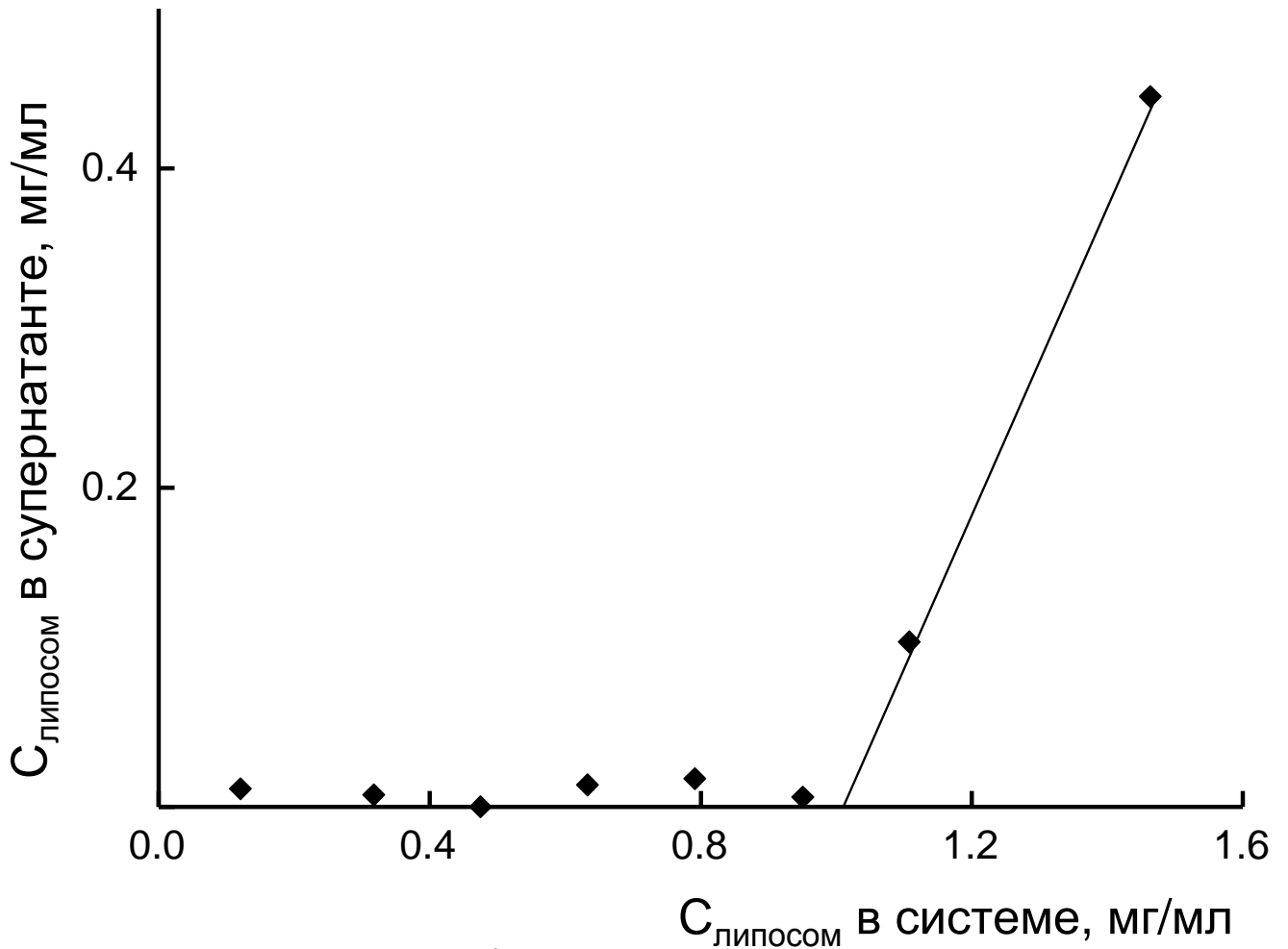


Рис. 29. Зависимость концентрации FC^{1-}/FX липосом в надосадочной жидкости от общей концентрации липосом в системе. $v = 0.1$; $[R_{60}L_{20}] = 1 \times 10^{-4}$ осново-моль/л; 10^{-2} М трис буфер, рН 7.0; $20^\circ C$

Данные, представленные на Рис. 29 хорошо согласуются с аналогичными данными для комплексов FC^{1-}/FX липосом с СК+ (Рис. 16, кривая 1). Рассчёт количества липосом, адсорбированных на одну везикулу, является затруднительным из-за наличия различных по размеру фракций.

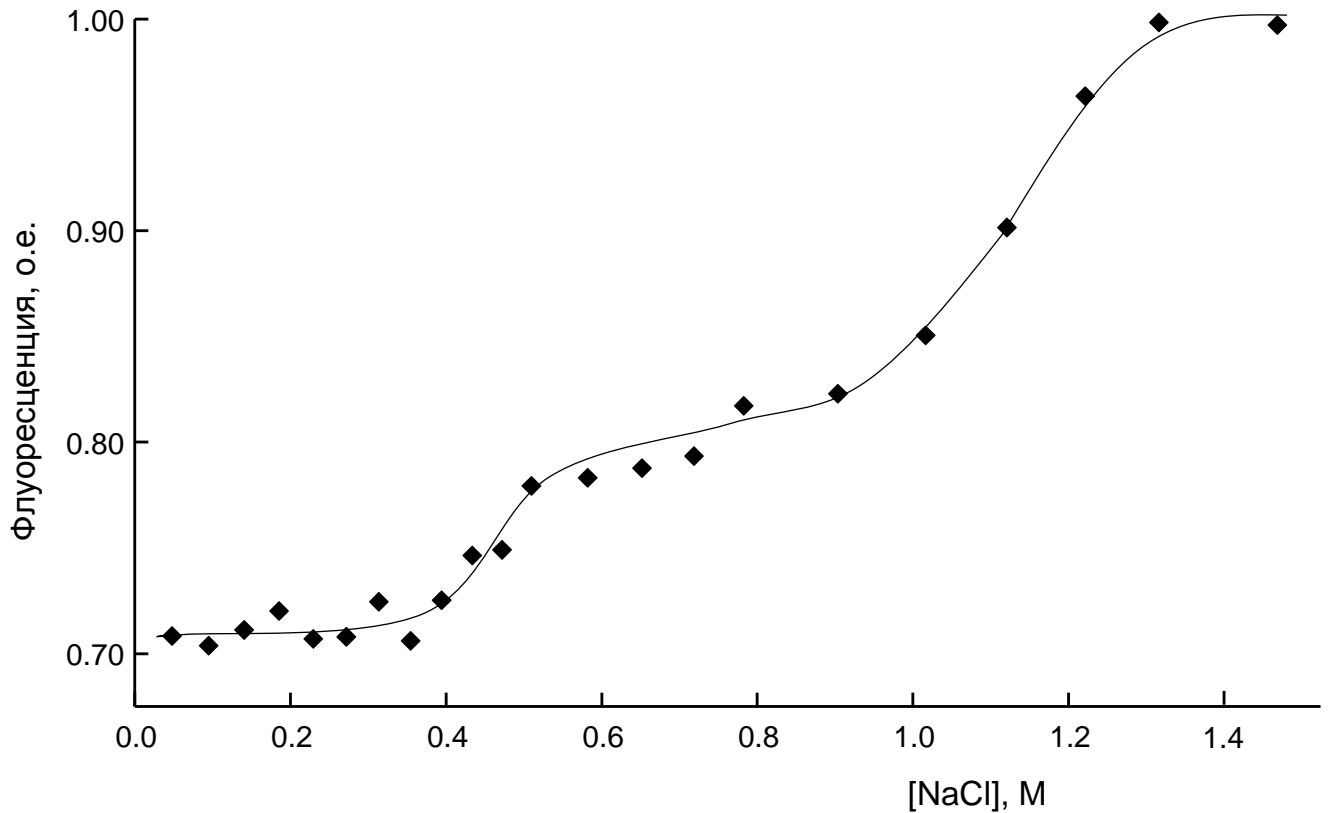


Рис. 30. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции комплекса полипептидные везикулы/меченые липосомы $\Phi C^{1-}/\Phi X$ от концентрации $NaCl$. Содержание анионного липида в липосомах $\nu = 0.1$. Общая концентрация липидов 1 мг/мл ; 10^{-2} М трис буфер, $pH 7.0$; $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Как видно из Рис. 30, комплексы $\Phi C^{1-}/\Phi X$ липосом с везикулами оказываются стабильным к диссоциации на исходные компоненты при физиологической ионной силе раствора. При дальнейшем увеличении ионной силы раствора происходит лишь частичная диссоциация комплекса. Наличие комплексов различного размера объясняет частичную диссоциацию: большая по размеру фракция оказывается устойчива к диссоциации, а меньшая диссоциирует. Теоретически это позволяет варьировать устойчивость комплекса изменением размера везикул, что может оказаться практически важным в дальнейшем.

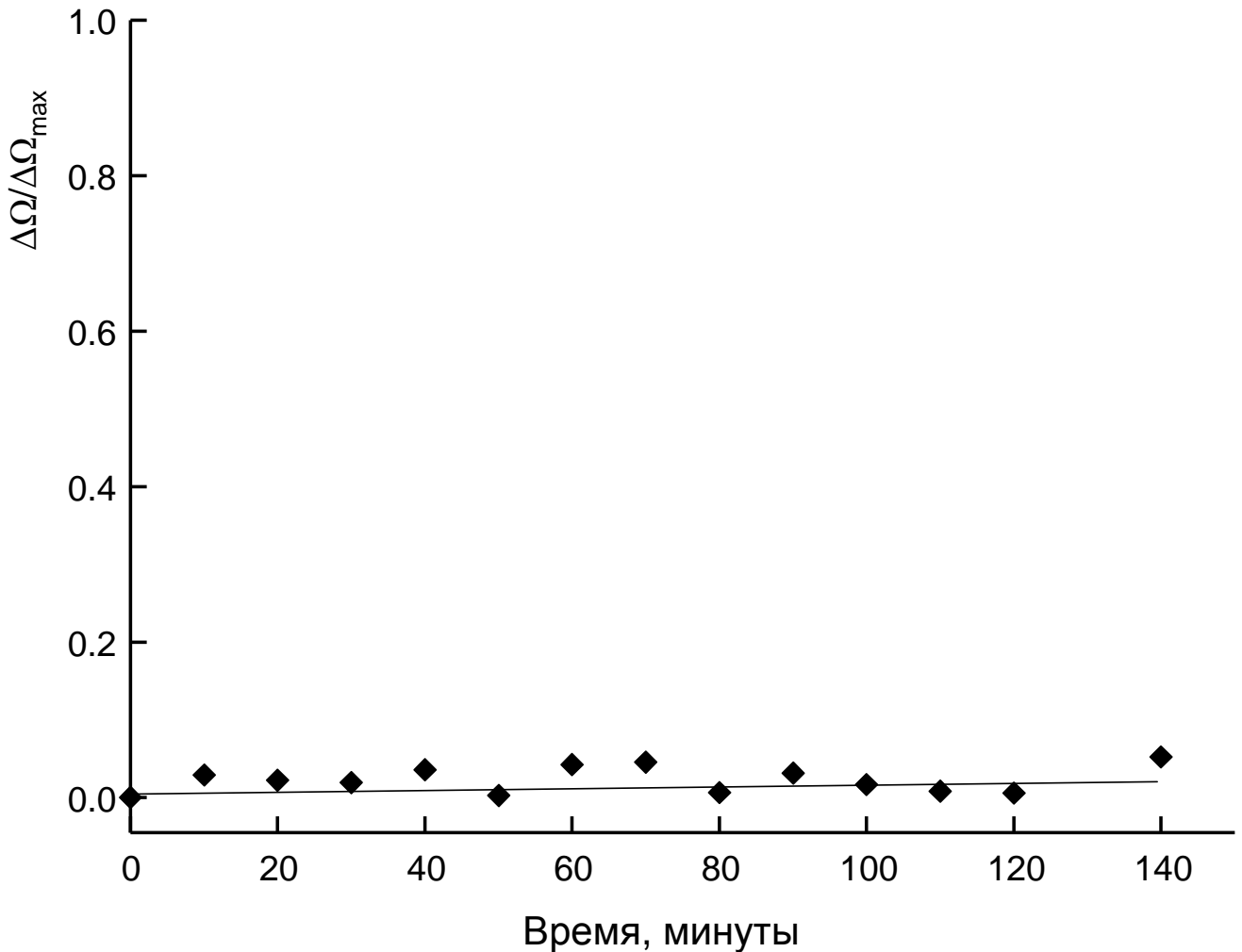


Рис. 31. Зависимость относительной электропроводности $\Phi C^{1-}/\Phi X$ липосомы-везикулы суспензии от времени. Общая концентрация липидов 1 мг/мл; $[\Phi C^{1-}]/[\text{везикулы}] = 2/3$; 10^{-2} М трис буфер, рН 7.0; 20 °С.

Для оценки биodeградируемости везикул и их комплексов были проведены опыты, где была исследована ферментативная устойчивость полипептидных везикул и их комплексов с липосомами по отношению к трипсину, который катализирует гидролиз пептидных связей в катионной части везикул, представленной блоком полиаргинина.

Для оценки устойчивости полиаргининовых везикул по отношению к ферменту были приготовлены растворы везикул концентрации 5×10^{-4} осново-моль/л в буфере ТРИС при рН = 8.0, поскольку оптимум каталитической активности трипсина находится в области рН = 7.8-8.0. Во всех опытах добавляли столько фермента, чтобы его концентрация в растворе составляла 0.03 масс. %.

Аналогично были приготовлены растворы комплексов везикул и анионных липосом ПОФС/ФХ для изучения их ферментативной устойчивости двух типов – с

избытком анионного (отрицательно-заряженные комплексы) и катионного (положительно-заряженные комплексы) компонентов. Далее к ним также добавляли фермент.

После приготовления растворов везикул и их комплексов в присутствии фермента в течение недели следили за изменением электрофоретической подвижности и размера частиц в растворах. Параллельно проводились измерения для контрольных растворов везикул и комплексов, не содержащих фермента.

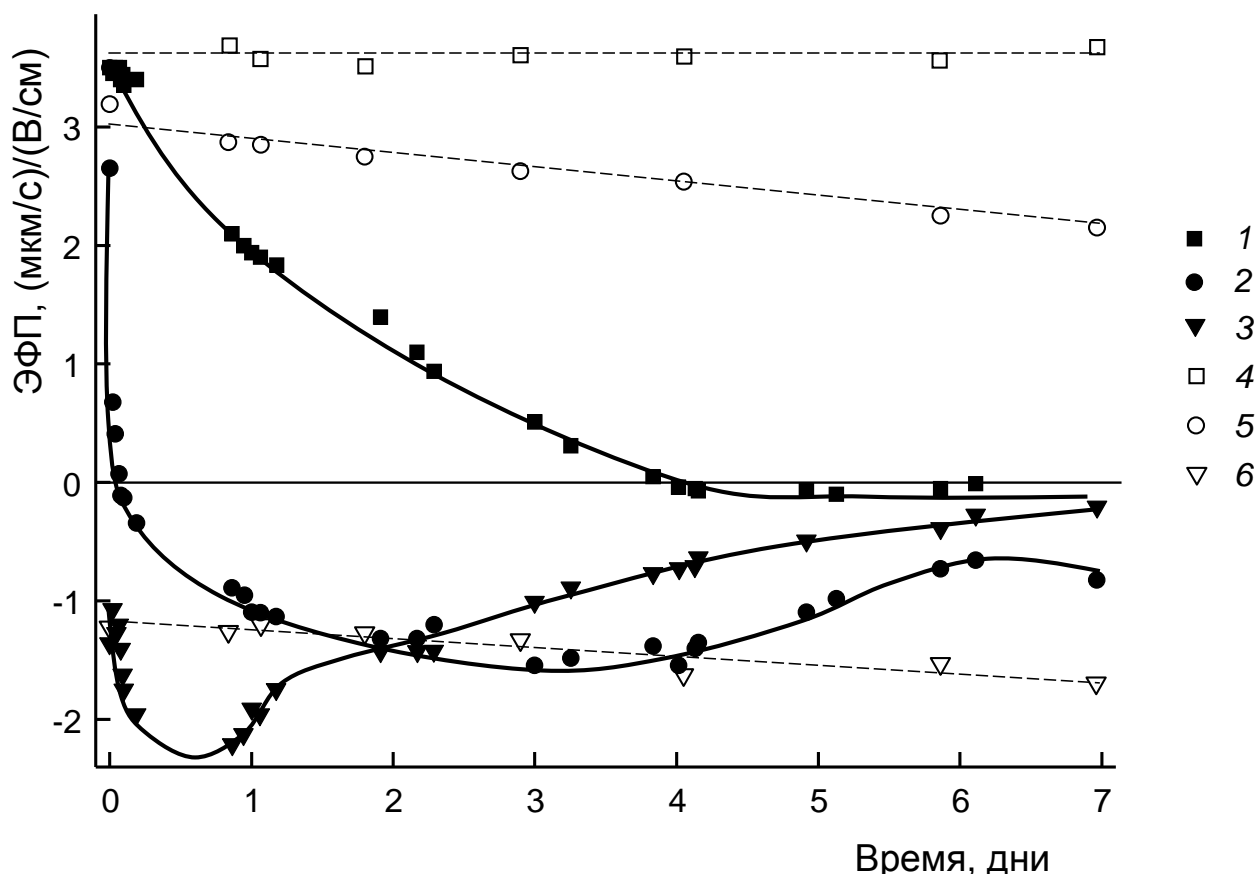


Рис. 32. Зависимость ЭФП везикул $R_{60}L_{20}$ (1 и 4), частиц положительно заряженного комплекса анионные липосомы ПОФС/ФХ-полипептидные везикулы (2 и 5) и частиц отрицательно заряженного комплекса ПОФС/ФХ-полипептидные везикулы (3 и 6) от времени в присутствии (1, 2 и 3) и в отсутствии (4, 5 и 6) фермента (трипсина); $v = 0.1$; $C_{\text{лип}} = 0,5$ мг/мл (2, 5); $C_{\text{лип}} = 1,5$ мг/мл (3, 6); $[N^+]_{\text{внеш}} = 5 \times 10^{-4}$ осново-моль/л; 10^{-2} М трис буфер; $pH = 8.0$; $T = 25$ °C.

На Рис. 32 приведены зависимости ЭФП от времени, полученные для везикул и их комплексов с анионными липосомами. Кривые 1 и 4 демонстрируют изменение ЭФП суспензий везикул в присутствии фермента и без него. Как видно из кривой 1 Рис. 32, значение ЭФП раствора везикул с ферментом с течением времени падает и выходит на плато. Таким образом, на четвертый день везикулы разрушаются под действием

фермента, а дальнейший отрицательный заряд, по-видимому, формирует отрицательно заряженный фермент в растворе. Параллельное измерение размеров показало уменьшение размера частиц. Начальный средний размер везикул составлял 460 нм, в области, соответствующей «0» ЭФП наблюдается агрегация и образование частиц размера порядка нескольких микрон. После выхода кривой 1 (Рис. 32) на плато размер частиц падает, достигая примерно 100 нм, что соответствует размеру молекулы трипсина.

Для наглядности представлены результаты контрольного опыта для суспензии везикул без добавления фермента (Рис. 32, кривая 4), в котором изменения значения ЭФП не наблюдается. Размер частиц также не меняется.

Комплексообразование полипептидных везикул с анионными липосомами не препятствует биодegradуемости везикул как в положительно так и в отрицательно заряженных комплексах (Рис. 32, кривые 2 и 3 соответственно). Комплексы полиаргининовые везикулы-анионные липосомы под действием трипсина разрушаются за время наблюдения. Как видно из кривой 2 Рис. 32, значение ЭФП раствора положительно заряженных комплексов с ферментом резко падает и достигает «0» уже через 15 минут после добавления фермента. Далее значение ЭФП падает и через 3-4 дня достигает минимального значения ЭФП. Затем значение ЭФП немного повышается и достигает значения для трипсина, что может говорить о полном разрушении полипептидных везикул под действием фермента. Параллельное измерение ЭФП раствора положительно заряженного комплекса без фермента также представлено на Рис. 32, кривая 5. Значение ЭФП слабо уменьшается с течением времени, что может быть связано с процессами окисления и разрушения липосом.

Аналогичные результаты, получены для отрицательно заряженных комплексов. Кривая 3 на Рис. 32 демонстрирует падение ЭФП в течение времени, что говорит о разрушении комплексов в избытке липосом. Агрегаты при этом не образуются, так как избыточный отрицательный заряд препятствует этому. Контрольные опыты в отсутствие ферментов представлены на Рис. 32, кривая 6. Из графиков видно, что в отсутствие фермента падение ЭФП происходит, но значительно слабее, чем при добавлении фермента.

В дополнение были проведены аналогичные эксперименты с использованием другого фермента – α -химотрипсина. Этот фермент преимущественно разлагает

пептидную связь при гидрофобных аминокислотах, содержащих ароматическое кольцо (тирозин, триптофан и фенилаланин). Однако, с меньшими скоростями гидролизует также лейцин и метионин. Оптимум каталитической активности α -химотрипсина лежит в области $pH = 7.5-8.2$.

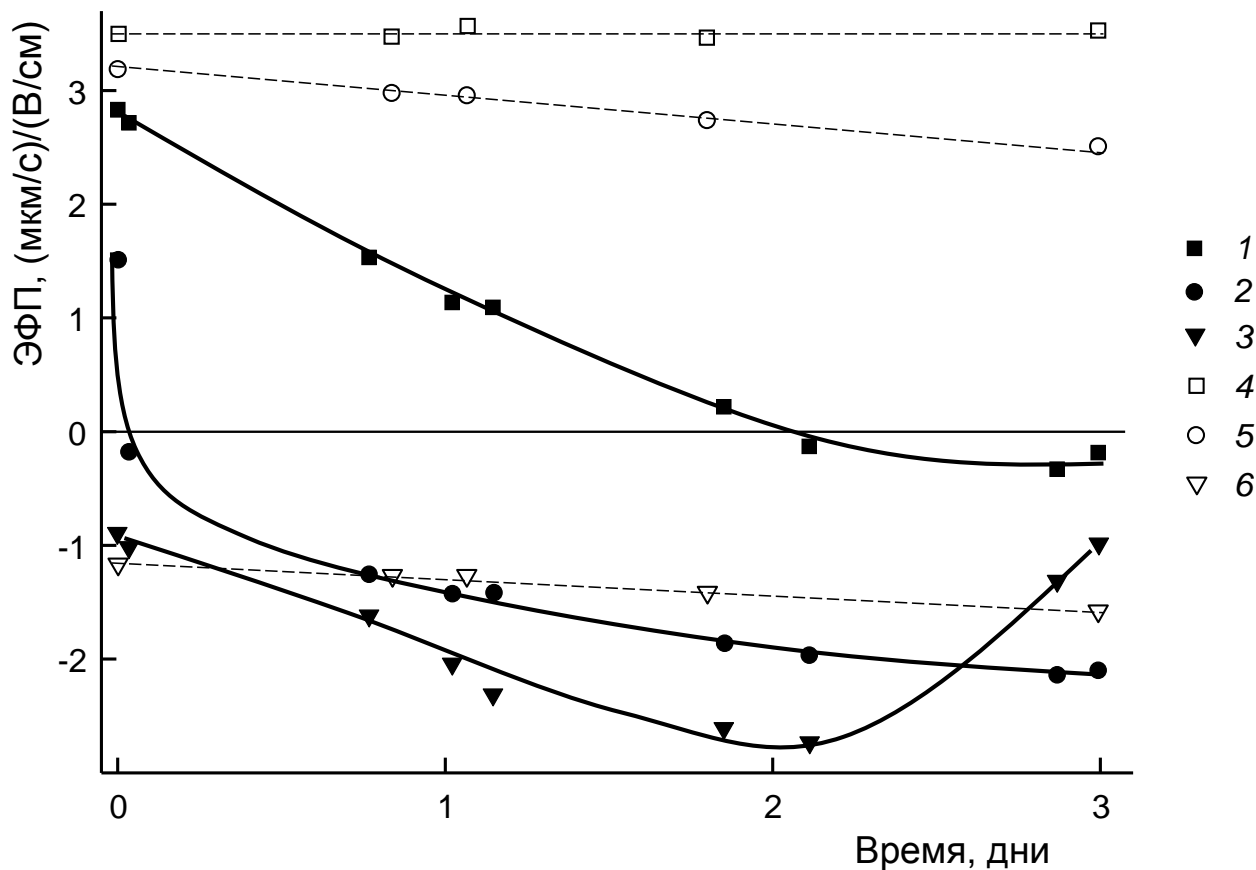


Рис. 33. Зависимость ЭФП везикул $R_{60}L_{20}$ (1 и 2), частиц положительно заряженного комплекса анионные липосомы ПОФС/ФХ-полипептидные везикулы (3 и 4) и частиц отрицательно заряженного комплекса ПОФС/ФХ-полипептидные везикулы (5 и 6) от времени в отсутствии (1, 3 и 5) и в присутствии (2, 4 и 6) фермента (α -химотрипсина); $v = 0.1$; $C_{\text{лип}} = 0,5 \text{ мг/мл}$ (3, 4); $C_{\text{лип}} = 1,5 \text{ мг/мл}$ (5, 6); $[N^+]_{\text{внеси}} = 5 \times 10^{-4} \text{ осново-моль/л}$; $10^{-2} \text{ М трис буфер}$; $pH = 8.0$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

На Рис. 33 приведены зависимости ЭФП от времени, полученные для везикул и их комплексов с анионными липосомами. Кривые аналогичны кривым, представленным на Рис. 32 с той лишь разницей, что для экспериментов с α -химотрипсином процессы шли быстрее. Как видно из кривой 1 Рис. 33, везикулы полностью разрушаются под действием α -химотрипсина уже на третий день.

Комплексообразование полипептидных везикул с анионными липосомами также не препятствует биodeградирuемости везикул как в положительно так и в отрицательно заряженных комплексах (Рис. 33, кривые 2 и 3 соответственно). Изменение ЭФП и

размеров для комплексов в отсутствие фермента не значимо и связано с процессами окисления и разрушения липосом.

Таким образом, была исследована ферментативная устойчивость полипептидных везикул и их комплексов с липосомами. Полипептидные везикулы демонстрируют биodeградируемость под воздействием фермента. Также обнаружено, что комплексообразование полипептидных везикул с анионными липосомами не препятствует биodeградируемости везикул.

5. ВЫВОДЫ

1. Установлено, что липосомы, сформированные из смеси нейтрального и анионного липидов, электростатически адсорбируются на поверхности полистирольных микросфер с привитыми поликатионными цепями («сферических поликатионных щеток»). Целостность адсорбированных липосом определяется мольной долей анионного липида (ν) и геометрией его молекул: для кардиолипина, молекулы которого имеют форму усеченного конуса, целостность липосом сохраняется при $\nu \leq 0.3$, для цилиндрических по форме молекул фосфатидилсерина при $\nu \leq 0.5$.

2. Предложена модель, описывающая роль привитых поликатионных цепей в сохранении целостности адсорбированных липосом. С одной стороны несущая высокий суммарный положительный заряд поликатионная корона обеспечивает эффективное электростатическое связывание нескольких десятков анионных липосом, а с другой предотвращает непосредственный контакт адсорбированных липосом с поверхностью полистирольного ядра.

3. Впервые продемонстрировано, что адсорбция липосом сопровождается переходом анионных липидов с внутренней стороны липосомальной мембраны на внешнюю (флип-флопом) и микрофазовым разделением липидов в мембране. При этом полное разделение на два типа доменов, состоящих из (1)электронейтральных липидов и (2)анионных липидов, электростатически связанных с катионными звеньями привитых макромолекул, наблюдается в липосомах с малым содержанием анионного липида (при $\nu = 0.1$).

4. Впервые получены мультилипосомальные комплексы с контролируемым соотношением инкапсулированных в липосомах веществ путем смешения водной суспензии поликатионных щеток и водной суспензии смеси липосом с разными гидрофобными и гидрофильными наполнителями.

5. Впервые получены комплексы, содержащие поликатионные щетки и липосомы со встроенным в мембрану «конформационным переключателем», диалкил-*транс*-3,4-дигидроксипиперидином. Адсорбированные липосомы высвобождают инкапсулированное вещество в ответ на уменьшение рН раствора, и скорость выхода данного вещества из мультилипосомальных комплексов в несколько раз превышает скорость его выхода из индивидуальных (не связанных в комплекс) липосом.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БЛМ** – бислойные липидные мембраны
- Докс** – противоопухолевый препарат на основе доксорубицина
- ДИЛ** – 1,1-диоктадециол-3,3,3',3'-тетраметилиндо-карбоцианин перхлорит
- ДМСО** – диметилсульфоксид
- ДОП** – транс-3,4-дигидроксипиперидин
- ДОФХ** – диолеилфосфатидилхолин
- ДОФЭ-СР** – 1,2-диолеил-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(лиссамин сульфородамин Б)
- ДПФС** – дипальмитоилфосфатидилсерин
- ДПФХ** – дипальмитоилфосфатидилхолин
- ДПФЭ-ФИТЦ** – дипальмитоил-фосфатидилэтанолламин, меченный флуоресцеинизотиоцианатом
- ДСК** – дифференциальная сканирующая калориметрия
- ККМ** – критическая концентрация мицеллообразования
- КЛ²** – кардиолипин
- Крио-ТЕМ** – криогенная трансмиссионная микроскопия
- Лак** – лакмус
- МЛВ** – мультиламеллярные везикулы
- ММВ** – малые мономламеллярные везикулы
- МТТ** – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид
- ПАВ** – поверхностно-активное вещество
- ПОФС** – пальмитоилолеилфосфатидилсерин
- ПЭВП** – поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид
- ПЭГ** – полиэтиленгликоль
- СК+** – сферические полкатионные щётки
- T_m** – температура основного фазового перехода липидов
- Теория ДЛВО** – теория коллоидной стабильности Дерягин-Ландау-Вервей-Овербек
- ТГФ** – тетрагидрофуран
- ФГ** – фосфатидилглицерол
- ФИТЦ** – флуоресцеинизотиоцианат

Флип-флоп – трансбислойная миграция липидов

ФС¹ – фосфатидилсерин

ФХ – фосфатидилхолин

ФЭА – фосфатидилэтаноламин

ЭФП – электрофоретическая подвижность

Эффект ППН – эффект повышенной проницаемости и накопления

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ЯЛ – яичный лецитин

7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Геннис, Р. Биологические мембраны: структура и функции / Р. Геннис. – Москва: Мир, 1997. – 625 с.
- 2 Dowham, W. Functional roles of lipids in membranes / W. Dowham, M. Bogdanov, E. Mileyskova // *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* / ed. by D.E. Vance, J.E. Vance. – Amsterdam: Elsevier, 2008. – p. 1-37.
- 3 Марголис, Л.Б. Липосомы и их взаимодействие с клетками / Л.Б. Марголис, Л.Д. Бергельсон. - Москва: Наука, 1981. – 240 с.
- 4 Holmberg, K. Surfactants and polymers in aqueous solution / K. Holmberg, B. Jonsson, B. Kronberg, B. Lindman. - Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. – 547 p.
- 5 Lipowsky, R. Handbook of biological physics: Vol. 1 Physical basis of self-organization and function of membranes: physics of vesicles / R. Lipowsky, E. Sackmann. - Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1995. - 519 p.
- 6 Lasic, D.D. Spontaneous vesiculation and spontaneous liposomes. / D.D. Lasic // *J Liposome Res.* - 1999. - V. 9 - № 1. - p. 43-52.
- 7 Huang, C. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characterization. / C. Huang // *Biochemistry.* - 1969. - V.8. - p. 344-351.
- 8 Deamer, D.W. Chapter 1. Liposomes preparation: Methods and mechanisms / D.W. Deamer, P.S. Uster // *Liposomes* / ed. By M.J. Ostro. - New York: Marcell Dekker, 1983. - p. 27-51.
- 9 *Liposomes. A practical approach* / ed. by R.R.C. New. - New York: Oxford University Press, 1990. – 301 p.
- 10 Sun, W-J. Structure of gel phase saturated lecithin bilayers. Temperature and chain length dependence / W-J. Sun, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, R.M. Suter // *Biophys. J.* – 1996. – V.71. – p. 885-891.
- 11 Nagle, J.F. Theory of lipid monolayer and bilayer phase transitions: effect of headgroup interactions. / J.F. Nagle // *J. Membr. Biol.* – 1976. – V.27. – p. 233–250.

- 12 McIntosh, T.J. Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. A molecular packing model / T.J. McIntosh // *Biophys. J.* – 1980. – V.29. – p. 237–246.
- 13 Nagle, J.F. Structure of lipid bilayers / J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle // *Biochim Biophys Acta.* – 2000. – V.1469. – № 3. – p. 159–195.
- 14 Sum, A.K. Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides / A.K. Sum, R. Faller, J.J. de Pablo // *Biophys J.* – 2003. – V.85. – p. 2830–2844.
- 15 Pan, J. Temperature dependence of structure, bending rigidity, and bilayer interactions of dioleoylphosphatidylcholine bilayers / J. Pan, S. Tristram-Nagle, N. Kučerka, J.F. Nagle // *Biophys J.* – 2008. – V.94. – p. 117–124.
- 16 Kornberg, R. Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane (spin-labeled phosphatidylcholine/nuclear resonance) / R. Kornberg, H.M. McConnell // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1971. – V.68. № 10. – p. 2564-2568.
- 17 Nagle, J.F. Structure of lipid bilayers. Part II / J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle // *Biochim Biophys Acta.* – 2001. – V.1479. – p. 189-211.
- 18 Sun, W-J. Biophysics Structure of the ripple phase in lecithin bilayers / W-J. Sun, S. J.F. Tristram-Nagle, R.M. Nagle Suter // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA (PNAS).* – 1996. – V.93. – p. 7008-7012.
- 19 Janiak, M.J. Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin / M.J. Janiak, D.M. Small, G.G. Shipley // *J Biol Chem.* – 1979. – V.254. – № 13, – p. 6068-6078.
- 20 Parente, R.A. Phase behavior of large unilamellar vesicles composed of synthetic phospholipids / R.A. Parente, B.R. Lentz // *Biochemistry.* – 1984. – № 23. – p. 2353-2362.
- 21 Tenchov, B.G. Lyotropic polymorphism of racemic dipalmitoylphosphatidylethanolamine. A differential Scanning calorimetry study / B.G. Tenchov, A.I. Boyanov, R.D. Koynova // *Biochemistry.* – 1984. – № 23. – p. 3553-3555.

- 22 Антонов, В.Ф. Липидные мембраны при фазовых превращениях / В.Ф. Антонов, Е.Ю. Смирнова, Е.В. Шевченко. - Москва: Наука, 1988. – 135 с.
- 23 Blume, A. Apparent molar heat capacities of phospholipids in aqueous dispersion. Effects of chain length and head group structure / A. Blume // *Biochemistry*. – 1983. – № 22. – p. 5436-5442.
- 24 Boggs, J.M. Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function / J.M. Boggs // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1987. - № 906. - p. 353-404.
- 25 Cevc, G. How membrane chain melting properties are regulated by the polar surface of the lipid bilayer / G. Cevc // *Biochemistry*. – 1987. – № 26. – p. 6305-6310.
- 26 Berde, C.B. A theory of the effects of head-group structure and chain unsaturation on the chain melting transition of phospholipid dispersions / C.B. Berde, H.C. Andersen, B.S. Hudson // *Biochemistry*. – 1980. – V.19. – p. 4279-4293.
- 27 Silvius, J.R. Thermotropic phase transitions of pure lipids in model membranes and their modifications by membrane proteins / J.R. Silvius. – New York: John Wiley & Sons, Inc., 1982. – 233 p.
- 28 Copeland, B.R. A theory of effect of protons and divalent cations on phase equilibria in charged bilayer membranes: comparison with experiment / B.R. Copeland, H.C. Andersen // *Biochemistry*. – 1982. – V.21. – p. 2811-2811.
- 29 Cullis, P.R. The polymorphic phase behaviour of phosphatidyletanolamines of natural and synthetic origin: a ^{31}P -NMR study / P.R. Cullis, B. de Kruijff // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1978. – № 513. – p. 31-42.
- 30 Killian, J.A. External addition of gramicidin induces HII phase in dioleoylphosphatidylcholine model membranes / J.A. Killian, A.J. Verkleij, J. Leumssen-Bijvelt, B. de Kruijff // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1985. – № 812. – p. 21-26.
- 31 Grit, M. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability / M. Grit, D.J.A. Crommelin // *Chem. Phys. Lipids*. - 1993. - № 64. - p. 3-18.

- 32 Zuidam, N.J. Physical (in)stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids / N.J. Zuidam, H.K.M.E. Gouw, Y. Barenholz, J.A. Crommelin // *Biochim Biophys Acta*. - 1995. - № 1240. - p. 101–110.
- 33 Zuidam, N.J. Differential scanning calorimetric analysis of dipalmitoylphosphatidylcholine–liposomes upon hydrolysis / N.J. Zuidam, D.J.A. Crommelin // *Int J Pharm*. - 1995. - 126. - p. 209-217.
- 34 Crommelin, J.A. Liposomes / J.A. Crommelin, H. Schreier // *Colloidal drug delivery systems* / ed. by J. Kreuter. - New York: Marcel Dekker, 1994. p. 73–190.
- 35 Lasic, D.D. Liposomes. From physics to applications / D.D. Lasic. Amsterdam: Elsevier, 1993. - 231 p.
- 36 Gregoriadis, G. Liposomes as drug carriers / G. Gregoriadis. Chichester: John Wiley and Sons, 1987. – 298 p.
- 37 Devissaguet ,J.P. Les Liposomes: Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques / J.P. Devissaguet, F. Puisieux. Paris: Les Editions Inserm, 1993.
- 38 Alving, C. Immunologic aspects of liposomes / C. Alving, R. Richards. // *Liposomes* / ed. by M. Ostro. New York: Marcel Dekker, 1983. – p. 209-288.
- 39 Nicolau, C. Les Liposomes: Applications therapeutiques / C. Nicolau, ed. by F. Puisieux, J. Delattre. Paris: Tec and Doc Lavoisier, 1985.
- 40 Derjaguin B.V. Theory of stability of highly charged lyophobic sols and adhesion of highly charged particles in solutions of electrolytes. / B.V. Derjaguin, L.D. Landau // *Acta Physicochim*. - 1941. – V. 14. - № 6. - p. 633-662.
- 41 Verwey, E.J.B. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids / E.J.B. Verwey, J.Th.G. Overbeck. Amsterdam: Elsevier, 1948.
- 42 Dorshow, R. Dynamic light scattering from cetyltrimethylammonium bromide micelles. Intermicellar interactions at low ionic strengths / R. Dorshow, J. Briggs, C.A. Bunton, D.F. Nicoli // *J. Phys. Chem*. - 1982. – V. 86. - № 3. - p. 2388-2395.
- 43 Ruso, J.M. Light scattering and NMR studies of the self-association of the amphiphilic molecule propranolol hydrochloride in aqueous electrolyte solutions / J.M. Ruso,

D. Attwood, C. Rey, P. Taboada, V. Mosquera, F. Sarmiento // *J. Phys. Chem. B.* - 1999. - V. 103. - № 34. - p. 7092-7096.

44 Ruso, J.M. Light scattering and NMR studies on the self-aggregation of sodium n-hexyl sulfate in aqueous electrolyte solution / J.M. Ruso, D. Attwood, P. Taboada, V. Mosquera, F. Sarmiento // *Langmuir.* - 2000. - V. 16. - № 4. - p. 1620-1625.

45 Taboada P. Self-association of the penicillin sodium nafcillin in aqueous solution / P. Taboada, D. Attwood, J.M. Ruso, M. García, F. Sarmiento, V. Mosquera // *Langmuir.* - 2000. - V. 16. - № 7. - p. 3175-3181.

46 Ruso, J.M. The self-association of acebutolol: Conductometry and light scattering / J.M. Ruso, J.L. López-Fontán, G. Prieto, F. Sarmiento // *J. Chem. Phys.* - 2003. - № 118. - p. 5964-5971.

47 Croll, S. DLVO theory applied to TiO₂ pigments and other materials in latex paints / S. Croll // *Prog. Org. Coat.* - 2002. - V. 44. - № 2. - p. 131-146.

48 Behrens, S.H. Aggregation in charge-stabilized colloidal suspensions revisited / S.H. Behrens, M. Borkovec, P. Schurtenberger // *Langmuir.* - 1998. - V. 14. - № 8. - p. 1951-1954.

49 Huang, H. On the restabilization of protein-covered latex colloids at high ionic strengths / H. Huang, M. Manciú, E. Ruckenstein // *Langmuir.* - 2005. - V. 21. - № 1. - p. 94-99.

50 Pollicanel, G. Phase coexistence in a DLVO model of globular protein solutions / G. Pollicanel, D. Costa, C. Caccamo // *J. Phys.: Condens. Matter.* - 2003. - № 15. - p. 375-384.

51 Bordi, F. Salt-induced aggregation in cationic liposome aqueous suspensions resulting in multi-step self-assembling complexes / F. Bordi, C. Cametti // *Colloids Surf. B.* - 2002. - V. 26. - № 4. - p. 341-350.

52 Nakamori, K. Stable positively charged liposome during long-term storage / K. Nakamori, T. Nakajima, M. Odawara, I. Koyama, M. Nemoto, T. Yoshida, H. Ohshima, K. Inoue // *Chem. Pharm. Bull.* - 1993. - № 41. - p. 1279-1283.

- 53 Sabín, J. On the effect of Ca²⁺ and La³⁺ on the colloidal stability of liposomes / J. Sabín, G. Prieto, P.V. Messina, J.M. Ruso, R. Hidalgo-Álvarez, F. Sarmiento // *Langmuir*. - 2005. - V. 21. - № 24. - p. 10968-10975.
- 54 Molina-Bolívar, J.A. The role played by hydration forces in the stability of protein-coated particles: non-classical DLVO behaviour / J.A. Molina-Bolívar, F. Galisteo-González, R. Hidalgo-Álvarez // *Colloids Surf. B*. - 1999. - V. 14. - № 1-4. - p. 3-17.
- 55 Tournois, H. Polymorphic phospholipid phase transitions as tools to understand peptide-lipid interactions / H. Tournois, B. de Kruijff // *Chem. Phys. Lipids*. - 1991. - V. 57. - № 2-3. - p. 327-340.
- 56 Smits, E. The effects of chain flexibility on the properties of vesicles formed from di-n-alkyl phosphates / E. Smits, M.J. Blandamer, B. Briggs P.M., Cullis, J.B.F.N. Engberts // *Reel. Trav. Chim. Pays-Bas*. - 1996. - № 115. - p. 37-43.
- 57 Saez, R. Detergent-like properties of polyethyleneglycols in relation to model membranes / R. Saez, A. Alonso, A. Villena, F.M. Goni // *FEBS Lett*. - 1982. - V.137. - № 2. - p.323-326.
- 58 Posse, M. Lysozyme interactions with phospholipid vesicles: relationships with fusion and release of aqueous content / M. Posse, B.F. De Arcuri, R.D. Morero // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1994. - V.1193. - № 1. - p.101-106.
- 59 Komatsu, H. Ethanol-induced aggregation and fusion of small phosphatidylcholine liposome: participation of interdigitated membraneformation in their processes. / H. Komatsu, S. Okada // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1995. - V.1235. - № 2. - p.270-280.
- 60 Stegmann, T. Protein-mediated membrane fusion / T. Stegmann, R.W. Doms, A. Helenius // *Annu. Rev. Biophys. Chem*. - 1989. - V. 18. - p.187-211.
- 61 Smith, B.A. Determination of molecular motion in membranes using periodic pattern photobleaching / B.A. Smith, H.M. McConnell // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. - 1978. - № 75. - p. 2759-2763.

- 62 Vaz, W.L.C. Photobleaching measurements of the lateral diffusion of lipids and proteins in artificial phospholipid bilayer membranes / W.L.C. Vaz, I. Derzko, K.A. Jacobson // *Cell Surface Reviews*. - 1982. - № 8. - p. 84-128.
- 63 Devaux, P. Lateral diffusion in spin-labeled phosphatidylcholine multilayers / P. Devaux, H.M. McConnell // *J. Amer. Chem. Soc.* - 1972. - № 94. 4475-4481.
- 64 McCown J.T. Degree of hydration and lateral diffusion in phospholipid multibilayers / J.T. McCown, E. Evans, S. Diehl, H.C. Wiles // *Biochemistry*. - 1981. - № 20. - p. 3134-3138.
- 65 Kuo, A.L. Lipid lateral diffusion by pulsed nuclear magnetic resonance / A.L. Kuo, C.G. Wade // *Biochemistry*. - 1979. - № 17. - p. 2300-2308.
- 66 Kornberg, R.D. Inside-outside transition of phospholipids in vesicle membranes / R.D. Kornberg, H.M. McConnell // *Biochemistry*. - 1971. - № 10. - p. 1111-1120.
- 67 Homan, R. Transbilayer diffusion of phospholipids: dependence on headgroup structure and acyl chain length / R. Homan, H.R. Pownall // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1988. - № 938. - p. 155-166.
- 68 de Kruijff, B. Effect of the phase transition on the transbilayer movement of dimyristoyl phosphatidylcholine in unilamellar vesicles / B. de Kruijff, E.J. Van Zoelen // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1978. - № 511. - p. 105-115.
- 69 Leontiadou, H. Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers / H. Leontiadou, A.E. Mark, S.J. Marrink // *Biophys. J.* - 2004. - V. 86. - p.2156–2164.
- 70 Vries, A. H. Molecular dynamics simulation of the spontaneous formation of a small DPPC vesicle in water in atomistic detail / A.H. Vries, A.E. Mark, S.J. Marrink, // *J. Am. Chem. Soc.* - 2004. - V. 126. - p. 4488–4489.
- 71 Yaroslavov, A.A. Polyelectrolyte-coated liposomes: Stabilization of the interfacial complexes / A.A. Yaroslavov, A.A. Rakhnyanskaya, E.G. Yaroslavova, A.A. Efimova, F.M. Menger // *Adv. Col. Inter. Sci.* - 2008. - V. 142. - p. 43–52.

- 72 Yaroslavov, A.A. Integrity of mixed liposomes contacting a polycation depends on the negatively charged content / A.A. Yaroslavov, E.A. Kiseliyova, O.Yu. Udalykh, V.A. Kabanov // *Langmuir*. - 1998. - V. 14. - p. 5160-5163.
- 73 Xiang, T-X. Liposomal drug transport: A molecular perspective from molecular dynamics simulations in lipid bilayers / T-X. Xiang, B.D. Anderson. // *Adv. Drug Del. Rev.* - 2006. - V. 58. - p. 1357–1378.
- 74 Drummond, D.C. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors / D.C. Drummond, O. Meyer, K.L. Hong, D.B. Kirpotin, D. Papahandjopoulos // *Pharmacological Rev.* - 1999. - V. 51. - p. 691-743.
- 75 Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А. Овчинников. - Москва: Просвещение, 1987. - 577 с.
- 76 Nii, T. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method / T. Nii, F. Ishii // *Int. J. Pharm.* - 2005. - V. 298. - № 1. - p. 198-205.
- 77 Thompson, A.K. Comparison of hydrophobic and hydrophilic encapsulation using liposomes prepared from milk fat globule-derived phospholipids / A.K. Thompson, A. Couchoud, H. Singh // *Dairy Sci. Technol.* - 2009. - V. 89. - p. 99-113.
- 78 Matsumura, Y. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy. Mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agents smancs / Y. Matsumura, H. Maeda // *Cancer Res.* - 1986. - № 46. - p. 6387-6392.
- 79 Matsumura, Y. Drug delivery systems in cancer chemotherapy / Y. Matsumura // *Biomedical polymers and polymer therapeutics* / ed. by E. Chiellini, J. Sunamoto. - Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2001. p. 37-52.
- 80 Yuan F. Optical biopsy of cancer: Nanotechnological aspects / F. Yuan, M. Delian, D. Fukumura, M. Leunig, D.A. Berk, V.P. Torchilin // *Tumori*. - 2008. - № 94. - p. 200-205.
- 81 Derycke, A.S.L. Liposomes for photodynamic therapy / A.S.L. Derycke, P.A.M. de Witte // *Adv. Drug Del. Rev.* - 2004. - V. 56. - p. 17-30.

- 82 Gregoriadis, G. Liposomes in Drug Delivery: Clinical, Diagnostic and Ophthalmic Potential / Gregoriadis G., Florence A.T. // *Drugs*. - 1993. - V. 45. - p. 15-28.
- 83 Senior J. H. Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors / J. H. Senior // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* - 1987. - V. 3. - p.123-193.
- 84 Schiffelers, R.M. Therapeutic efficacy of liposomal gentamicin in clinically relevant rat models / R.M. Schiffelers, G. Storm, I.A. Bakker-Woudenberg // *Int. J. Pharm.* - 2001. - V. 214. - p. 103-105.
- 85 Janknegt, R. Liposomal formulations of cytotoxic drugs / R. Janknegt // *Support. Care Cancer*. - 1996. - V. 4. - p. 298-304.
- 86 Boswell, G.W. AmBisome (liposomal amphotericin B): a comparative review / G.W. Boswell, D. Buell, I. Bekersky, // *J. Clin. Pharmacol.* - 1998. - V. 38. - p. 583-592.
- 87 Ayyagari, A.L. Long-Circulating Liposomal Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging / A.L. Ayyagari, X. Zhang, K.B. Ghaghada, A. Annapragada, X. Hu, R.V. Bellamkonda // *Magn. Reson. Med.* - 2006. - V. 55. - p. 1023-1029.
- 88 Storm, G. Liposomes: quo vadis? / G. Storm, D.J.A. Crommelin // *PSTT*. - 1998. - V. 1. - p. 19-31.
- 89 Yuan, F. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (Stealth) liposomes in a human tumor xenograft. / F. Yuan, M. Leunig, S.K. Huang, D.A. Berk, D. Papahadjopoulos, R.K. Jain // *Cancer Res.* - 1994. - V. 54. - p. 3352-3356.
- 90 Mizuguchi, H. Efficient gene transfer into mammalian cells using fusogenic liposome / H. Mizuguchi, T. Nakagawa, M. Nakanishi, S. Imazu, S. Nakagawa // *T. Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1996. - V. 218. - p. 402-407.
- 91 Torchillin, V.P. Affinity liposomes in vivo: factors influencing target accumulation / V.P. Torchillin // *J. Mol. Recognition*. - 1996. - V. 9. - p. 335-346.
- 92 Laverman, P. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation / P. Laverman, O.C. Boerman, W.J. Oyen, E.T. Dams, G. Storm, F.H. Corstens // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* - 1999. - V. 37. - p. 225-235.

93 Schwarze, S.R. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA / S.R. Schwarze, S.F. Dowdy // Trends Pharmacol. Sci. - 2000. - V. 21. - p. 45-48.

94 Vermehren, C. Activity of mammalian secreted phospholipase A(2) from inflammatory peritoneal fluid towards PEG-liposomes. Early indications / C. Vermehren, K. Jorgensen, R. Schiffelers, S. Frokjaer // Int. J. Pharm. - 2001. - V. 214. - p. 93-98.

95 Vermehren, C. Influence of lipopolymer concentration on liposome degradation and blood clearance / C. Vermehren, K. Jorgensen, S. Frokjaer // Int. J. Pharm. - 1999. - V. 183. - p. 13-16.

96 Buiting, A.M. Liposome mediated depletion of macrophages: an approach for fundamental studies / A.M. Buiting, N. Van Rooijen // J. Drug Target. - 1994. - V. 2. - p. 357-362.

97 Schmidt-Weber, C.B. Apoptotic cell death in activated monocytes following incorporation of clodronate-liposomes / C.B. Schmidt-Weber, M. Rittig, E. Buchner, I. Hauser, I. Schmidt, E. Palombo-Kinne, F. Emmrich, R.W. Kinne // J. Leukoc. Biol. - 1996. - V. 60. - p. 230-244.

98 Samoshin, V.V. Trans-2-Aminocyclohexanols as pH-triggers for conformationally controlled crowns and podands / V.V. Samoshin, V.A. Chertkov, D.E. Gremyachinsky, E.K. Dobretsova, A.K. Shestakova, L.P. Vatlina // Tetrahedron Lett. - 2004. - V. 45. - № 42. - p. 7823-7826.

99 Zhang, L. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments / L. Zhang, F.X. Gu, J.M. Chan, A.Z. Wang, R.S. Langer, O.C. Farokhzad // Clinical Pharmacology and Therapeutics. - 2008. - V. 83. - p. 761-769.

100 Patil, S.G. Preparation of liposomes / S.G. Patil, S.G. Gattani, R.S. Gaud, S.J. Surana, S.P. Dewani, H.S. Mahajan // The Pharma Review. - 2005. - V. 18. - № 3. - p. 53-58.

101 Richter, R.P. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View / R.P. Richter, R. Bérat, A.R. Brisson // Langmuir. - 2006. - V. 22. - № 8. - p. 3497-3505.

- 102 Yoshina-Ishii, C. Arrays of mobile tethered vesicles on supported lipid bilayers / C. Yoshina-Ishii, S.G. Boxer // *J. Am. Chem. Soc.* - 2003. - V. 125. - № 13. - p. 3696-3697.
- 103 Yoshina-Ishii, C. General Method for Modification of Liposomes for Encoded Assembly on Supported Bilayer / C. Yoshina-Ishii, G.P. Miller, M.L. Kraft, E.T. Kool, S.G. Boxer // *J. Am. Chem. Soc.* - 2005. - V. 127. - № 5. - p. 1356-1357.
- 104 Galla, H.J. Chemically induced lipid phase separation in model membranes containing charged lipids: a spin label study / H.J. Galla, E. Sackmann // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1975. - V. 401. - № 3. - p. 509-529.
- 105 McIntosh, T.J. The molecular organization of asymmetric lipid bilayers and lipid-peptide complexes / T.J. McIntosh, R.C. Waldbillig, J.D. Robertson // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1977. - V. 466. № 2. - p. 209-230.
- 106 King, T.E. Stabilization of a lipid bilayer membrane by polylysine / T.E. King, L.K. Steinrauf // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1972. - V. 49. - №6. - p. 1433-1437.
- 107 Carrier, D. Investigation of polylysine-dipalmitoylphosphatidylglycerol interactions in model membranes / D.Carrier, M. Pezolet // *Biochemistry.* - 1986. - V. 25. № 14. - p. 4167-4174.
- 108 Yaroslavov, A.A. Effect of polylysine on transformations and permeability of negative vesicular membranes / A.A. Yaroslavov, O.Ye. Kuchenkova, I.B. Okuneva, N.S. Melik-Nubarov, N.O. Kozlova, V.I. Lobyshev, V.A. Kabanov, F.M. Menger // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2003. - V. 1611. - p. 44-54.
- 109 Tribet, C. Flexible macromolecules attached to lipid bilayers: impact on fluidity, curvature, permeability and stability of the membranes / C. Tribet, O.F. Vial // *Soft Matter.* - 2008. - V. 4. - p. 68-81.
- 110 Kabanov, V.A. What happens to negatively charged lipid vesicles upon interacting with polycation species? / V.A. Kabanov, A.A. Yaroslavov // *J. Control Release.* - 2002. - V. 78. - p. 267-271.

111 Polozova, A. Mechanism of the interaction of hydrophobically-modified poly-(N-isopropylacrylamides) with liposomes / A. Polozova, F.M. Winnik // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1997. - V. 1326. - p. 213-228.

112 Kevelam, J. Polymer–Surfactant Interactions Studied by Titration Microcalorimetry: Influence of Polymer Hydrophobicity, Electrostatic Forces, and Surfactant Aggregational State / J. Kevelam, J. F. L. van Breemen, W. Blokzijl, J. Engberts // *Langmuir.* - 1996. - V. 12. - p. 4709-4717.

113 Israelachvili, J.N. Intermolecular and surface forces / J.N. Israelachvili. - New York: Academic Press, 1992.

114 Boon, J.M. Facilitated phosphatidylcholine flip-flop across erythrocyte membranes using low molecular weight synthetic translocases / J.M. Boon, B.D. Smith // *J. Am. Chem. Soc.* - 2001. - V. 123. - p. 6221-6226.

115 Yaroslavov, A.A. Reversibility of structural rearrangements in the negative vesicular membrane upon electrostatic adsorption/desorption of polycation / A.A. Yaroslavov, A.A. Efimova, V.I. Lobyshev, V.A. Kabanov // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2002. - V. 1560. - № 1. - p. 14-22.

116 Yaroslavov, A.A. Polymer-induced flip-flop in biomembranes / A.A. Yaroslavov, N.S. Melik-Nubarov, F.M. Menger // *Acc. Chem. Res.* - 2006. - V. 39. - № 10. - p. 702-710.

117 Ярославов, А.А. О кардинальном различии во взаимодействии отрицательно заряженных липосом с полилизинном и поли-М-этил-4-винилпиридиний бромидом / А.А. Ярославов, О.Е. Кученкова, Е.Г. Ярославова, В.А. Кабанов // *ДАН.* - 1997. - V. 354. - p. 350-352.

118 Yaroslavov, A.A. Biomembrane sensitivity to structural changes in bound polymers / A.A. Yaroslavov, T.A. Sitnikova, A.A. Rakhnyanskaya, E.G. Yaroslavova, D.A. Davydov, T.V. Burova, V.Ya. Grinberg, L. Shi, F.M. Menger // *J. Am. Chem. Soc.* - 2009. - V. 131. - № 5. - P. 1666-1667.

119 Yaroslavov, A.A. Synthetic polycations on the surface of negatively charged liposomes / A.A. Yaroslavov, V.E. Kul'kov, A.A. Efimova, M.O. Ignatiev // *Thin Solig Films*. - 1995. - V. 265. - № 1-2. - p. 66-70.

120 Yaroslavov, A.A. Polyelectrolyte-coated liposomes: stabilization of the interfacial complexes / A.A. Yaroslavov, A.A. Rakhnyanskaya, E.G. Yaroslavova, A.A. Efimova, F.M. Menger // *Advances in colloid and interface science*. - 2008. - V. 142. - № 1-2. - p. 43-52.

121 Menger, F.M. Migration of poly-L-lysine through a lipid bilayer / F.M. Menger, V.A. Seredyuk, M.V. Kitaeva, A.A. Yaroslavov, N.S. Melik-Nubarov // *J. Am. Chem. Soc.* - 2003. - V. 125. - № 10. - p. 2846-2847.

122 Yaroslavov, A.A. A polycation causes migration of negatively charged phospholipids from inner to outer leaflet of the liposomal membrane / A.A. Yaroslavov, V.E. Kul'kov, A.S. Polinsky, B.A. Baibakov, V.A. Kabanov // *FEBS Lett.* - 1994. - V. 340. - p. 121-123.

123 Yaroslavov, A.A. Integrity of mixed liposomes contacting a polycation depends on the negatively charged lipid content / A.A. Yaroslavov, E.A. Kiseliova, O.Yu. Udalykh, V.A. Kabanov // *Langmuir*. - 1998. - V. 14. - № 18. - p. 5160-5163.

124 Bordi, F. Direct evidence of multicompartiment aggregates in polyelectrolyte-charged liposome complexes / F. Bordi, C. Cametti, S. Sennato, M. Diociaiuti // *Biophys. J.* - 2006. - V. 91. - p. 1513–1520.

125 Bordi, F. Strong repulsive interactions in polyelectrolyte-liposome clusters close to the isoelectric point: a sign of an arrested state / F. Bordi, C. Cametti, S. Sennato, D. Truzzolillo // *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* - 2007. - V. 76. - № 6. - p. 061403-1 - 0614031-2.

126 Sybachin, A.V. Complexation of polycations to anionic liposomes: Composition and structure of interfacial complexes / A.V. Sybachin, A.A. Efimova, E.A. Litmanovich, F.M. Menger, A.A. Yaroslavov // *Langmuir*. - 2007. - V. 23. - p. 10034-10039.

127 Yaroslavov, A.A. Conventional and gemini surfactants embedded within bilayer membranes: contrasting behavior / A.A. Yaroslavov, E.A. Kiseliyova, O.Yu. Udalykh, V.A. Kabanov, Yu.A. Ermakov, V.A. Azov, F.M. Menger // *Chem. Eur. J.* – 2001. – V.7. – p. 4835-4843.

128 Kitaeva, M.V. Membrane transport of a polyacid-tied doxorubicin / M.V. Kitaeva, N.S. Melik-Nubarov, F.M. Menger, A.A. Yaroslavov // *Langmuir.* – 2004. – V.20. – p. 6796-6799.

129 Taguchi, H. Carboxyfluorescein leakage from poly(ethylene glycol)-grafted liposomes induced by the interaction with serum / H. Taguchi, H. Sakai, M. Abe, Y. Saito // *Chem. Pharm. Bull.* – 2006. – V.54. – p. 80-84.

130 Yaroslavov, A.A. Electrostatically driven complexation of liposomes with a star-shaped polyelectrolyte to low-toxicity multi-liposomal assemblies / A.A. Yaroslavov, A.V. Sybachin, O.V. Zaborova, D.V. Pergushov, A.B. Zezin, N.S. Melik-Nubarov, F.A. Plamper, A.H.E. Müller, F.M. Menger // *Macromol. Biosci.* – 2014. – V.14. – № 4. – p. 491-495.

131 Brazdova, B. trans-2-Aminocyclohexanol as a pH-sensitive conformational switch in lipid amphiphiles / B. Brazdova, N. Zhang, V.V. Samoshin, X. Guo // *Chem. Commun.* – 2008. – V.39. – p. 4774-4776.

132 Mei, Y. Engineering the interaction of latex spheres with charged surfaces: AFM investigation of spherical polyelectrolyte brushes on mica / Y. Mei, A. Wittemann, G. Sharma, M. Ballauff, Th. Koch, H. Gliemann, J. Horbach, Th. Schimmel // *Macromolecules.* – 2003. – № 36. – p. 3452-3456.

133 Samokhina, L. Binding of oppositely charged surfactants to spherical polyelectrolyte brushes: A study by cryogenic transmission electron microscopy / L. Samokhina, M. Schrunner, M. Ballauff // *Langmuir.* – 2007. – V. 23. – № 7. – p. 3615-3619.

134 Bellare, J.R. Controlled environment vitrification system: an improved sample preparation technique. / J.R. Bellare, H.T. Davis, L.E. Scriven, Y.J. Talmon // *J. Electron Microsc. Tech.* – 1988. – V.10. – № 1. – p. 87-111.

135 San Juan, A. Quaternized poly(4-vinylpyridine)s as model gene delivery polycations: structure-function study by modification of side chain hydrophobicity and degree of alkylation / A. San Juan, D. Letourneur, V.A. Izumrudov // *Bioconjug. Chem.* – 2007. – V.18. – № 3. – p. 922-928.

136 Efimova, A.A., Effect of anionic-lipid-molecule geometry on the structure and properties of liposome-polycation complexes / A.A. Efimova, A.V. Sybachin, A.A. Yaroslavov // *Polymer Sciences Series C.* – 2011. – V.53. – № 1 – p. 89-96.