

УДК 577.352.2

ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАН-ГЛИКОЛЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АНИОННЫХ ЛИПОСОМ

И.М. Дейген, Е.В. Кудряшова

(кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; e-mail: i.m.deygen@gmail.com)

Показана возможность использования хитозан-гликоля для получения стабилизированных липосомальных контейнеров для доставки доксорубина. Определены константы диссоциации комплексов липосом с хитозан-гликолем ($3,4 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ в зависимости от агрегатного состояния липосом). Продемонстрировано, что в случае комплексов липосом с хитозан-гликолем наблюдается существенный эффект пролонгации высвобождения доксорубина из липосом при pH 7,4.

Ключевые слова: доксорубин, липосомы, хитозан, ИК-спектроскопия Фурье.

Создание биосовместимых носителей для лекарственных препаратов – важная задача биомедицинской химии. Основные требования, предъявляемые к носителям, заключаются в нетоксичности, биodeградируемости, отсутствии иммунного ответа и возможности пролонгированного действия.

Одной из удовлетворяющих этим требованиям систем являются липосомы – биосовместимые липидные везикулы. Однако до сих пор широкое применение липосом в медицинских целях ограничено в виду ряда проблем. Липосомы термодинамически нестабильны и склонны к агрегации [1], следовательно, актуальной является задача получения стабилизирующих добавок на основе биосовместимых полимерных материалов и изучение структурно-функциональных свойств получаемых комплексов.

Ранее нами был показан существенный эффект стабилизации мембраны за счет комплексообразования с ПЭГ-хитозаном [2]. В данной работе предложен подход к получению стабилизированной за счет комплексообразования с хитозан-гликолем липосомальной формы доксорубина.

Цель работы – исследование структурно-функциональных свойств комплексов липосом с хитозан-гликолем: определение основных сайтов связывания, состава и констант диссоциации комплексов, исследование процесса высвобождения модельного лекарственного препарата доксорубина.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Кардиолипид (КЛ) (динатриевая соль, раствор в хлороформе, 25 мг/мл); дипальмитоилфосфати-

дилхолин (ДПФХ, раствор в хлороформе); яичный лецитин (раствор в хлороформе) – препараты фирмы «Avanti Polar Lipids» (США); хитозан-гликоль, доксорубин гидрохлорид («Sigma-Aldrich», США).

ИК-спектроскопия. ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре Фурье «Tensor 27» («Bruker», Германия), измерения проводили в термостатируемой ячейке нарушенного полного внутреннего отражения с использованием кристалла однократного отражения ZnSe, при 22°C и постоянной скорости продувки системы очищенным сухим воздухом (установка Jun Air).

Метод динамического светорассеяния. Определение размеров везикул проводили с помощью Zetasizer Nano S «Malvern» (Англия) (4 мВт He-Ne-лазер, 633 нм) в термостатируемой ячейке при 22°C.

Флуоресцентный анализ. В кварцевую кювету Helmet помещали 1 мл аналита, регистрировали спектр эмиссии при длине волны возбуждения 480 нм в интервале от 490 до 600 нм с помощью флуориметра «Varian Cary Eclipse» (США). Определяли интенсивность пика на 590 нм.

Получение малых моноламеллярных липосом, загруженных модифицированным доксорубином. Липиды брали в весовом соотношении ДПФХ:КЛ (80:20), вводили раствор доксорубина в желаемом количестве и тщательно удаляли органический растворитель на вакуумном роторном испарителе при температуре 55°C. Образующуюся тонкую пленку липидов диспергировали в 2 мл 0,01 М боратного буфера (pH 9,0). Препарат обрабатывали ультразвуком (22 кГц) в течение 600 с (3×200 с) в непрерыв-

ном режиме при постоянном охлаждении на ультразвуковом диспергаторе 4710 («Cole-Parmer Instrument», США). Свободный доксорубицин отделяли диализом против боратного буферного раствора (Serva MW cut-off 3500).

Получение комплексов липосом с хитозан-гликолем. К раствору липосом в боратном буфере (5 мг/мл) добавляли по каплям при перемешивании раствор полимера в основомольном соотношении липосомы:полимер, равном 1:0,5; 1:1 и 1:2, после чего комплексы инкубировались (1 ч, 37°C) при интенсивном перемешивании. Для получения комплексов жидкокристаллических липосом с хитозан-гликолем липосомальную суспензию предварительно нагревали до температуры 40°C, и получали комплексы по вышеприведенной методике.

Определение состава комплексов липосомы-хитозан-гликоль проводили согласно методике, описанной в работе [3]. Готовили комплексы с постоянной концентрацией липосом и различной концентрацией полимера (как описано в предыдущем разделе), несвязавшийся с липосомами полимер отделяли центрифугированием. Супернатант, содержащий несвязавшийся полимер, и осадок, содержащий комплекс, изучали по отдельности, определяя количество хитозан-гликоля по интенсивностям полос поглощения 1551 и 1414 см⁻¹.

Исследование процесса высвобождения доксорубина. Методом диализа проводили смыв буферного раствора липосом: на ацетатный (рН 5,5 для имитации опухолевой клетки) или фосфатный (рН 7,4). Затем липосомальную суспензию переносили в диализный мешок (Serva MW cut-off 3500) и помещали на качалку (37°C). В течение 60 ч отбирали пробы внешнего рас-

твора, детектировали спектр эмиссии флуоресценции.

Обсуждение результатов

Для разработки новых липосомальных контейнеров, стабилизированных за счет образования комплекса с полимером, необходимо располагать исчерпывающей информацией о процессе комплексообразования. Для детального изучения данного процесса и определения сайтов связывания полимера на поверхности мембраны в качестве основного и дополнительного методов исследования мы выбрали ИК-спектроскопию и метод динамического светорассеяния.

ИК-спектроскопия – надежный и удобный метод анализа структуры, свойств липосом и их комплексов. На ИК-спектре липидов присутствует ряд наиболее интенсивных и высокоинформативных полос поглощения, а именно: две полосы поглощения, соответствующие симметричным и асимметричным колебаниям углеводородных связей (2853±5 и 2926±5см⁻¹), полоса поглощения карбонильной группы C=O (1730–1750 см⁻¹), а также асимметричные валентные колебания фосфатной группы (1220–1260 см⁻¹) [4].

Ранее [2] мы показали, что при комплексообразовании липосом с ПЭГ-хитозаном основными сайтами связывания являются свободные аминогруппы хитозана и анионные группы липидов, что отражается на ИК-спектре липосом высокочастотным сдвигом полос поглощения карбонильной и фосфатной групп. Связывание с ПЭГ-хитозаном вызывает также снижение подвижности ацильных цепей, что отражается на спектре низкочастотным сдвигом полос поглощения асимметричных и симметричных валентных колебаний СН₂-групп. Положение основных полос поглощения комплекса

Т а б л и ц а 1

Частота характеристических полос поглощения в ИК-спектрах и величина гидродинамического радиуса липосом ДПФХ:КЛ (80:20 по весу) в комплексе с хитозан-гликолем и ПЭГ-хитозаном в основомольном соотношении липосомы:полимер = 1:1 в сравнении со свободными липосомами

Образец	Частота колебаний групп, см ⁻¹				Интерпретация	Радиус, нм
	CH ₂ as	CH ₂ s	C=O	PO ₂		
Липосомы	2920	2851	1729	1220	гелеобразное состояние	60±2
Липосомы:хитозан-гликоль	2920	2851	1740, 1729	1220, 1247	взаимодействие полимера только с анионными группами	78±3
Липосомы:ПЭГ-хитозан [2]	2917	2849	1744	1263	взаимодействие полимера с анионными группами, снижение подвижности гидрофобной части бислоя	85±4

липосом с хитозан-гликолем в сравнении с несвязанными липосомами представлено в табл. 1.

Несколько иную картину мы наблюдали в случае комплексообразования с хитозан-гликолем. Полосы поглощения ацильных цепей не претерпевают сдвигов, что указывает на неизменность состояния гидрофобной части бислоя. Напротив, полосы поглощения карбонильной и фосфатной групп претерпевают высокочастотные сдвиги, указывающие на снижение степени гидратации за счет образования водородных связей с хитозан-гликолем (табл. 1). Примечательно расщепление полосы поглощения фосфатной группы в результате комплексообразования. Появление компоненты 1247 см^{-1} указывает на участие некоторых фосфатных групп, расположенных на внешнем слое мембраны, в комплексообразовании.

Таким образом, хитозан-гликоль, в отличие от ПЭГ-хитозана, не способен взаимодействовать с гидрофобной частью гелеобразного бислоя, образуя на поверхности мембраны электростатические связи с анионными группами липидов. О комплексообразовании свидетельствует также увеличение среднего размера везикул. Так, несвязанные липосомы характеризуются средним радиусом 60 ± 2 нм. Образование комплекса с хи-

тозан-гликолем приводит к увеличению радиуса до 78 ± 3 нм, тогда как связывание ПЭГ-хитозана приводит к образованию везикул 85 ± 4 нм. Вероятно, меньший радиус полимерной «шубы» в случае хитозан-гликоля можно объяснить меньшей молекулярной массой заместителя хитозана.

Комплексообразование с гликоль-хитозаном позволяет получать многоточечные электростатические комплексы, однако из литературы известно, что фазовое состояние липосом оказывает существенное влияние на процесс комплексообразования [5]. Показано, что при нагревании до $37\text{--}45^\circ\text{C}$ липосомы претерпевают фазовый переход из гелеобразного в жидкокристаллическое состояние, сопровождающийся ростом подвижности гидрофобных цепей. В жидкокристаллических липосомах за счет более рыхлой структуры также существенно увеличивается вероятность миграции липидов в пределах как поверхностного слоя, так и «флип-флоп»-перехода, при котором липид переходит с внутреннего слоя во внешний. Таким образом, предварительный нагрев липосомальной суспензии может привести к изменению характера взаимодействия, что отразится на величинах констант диссоциации комплексов. Для определения величин констант и вы-

Т а б л и ц а 2

Частота характеристических полос поглощения в ИК-спектрах липосом ДПФХ:КЛ (80:20 по весу) в комплексе с хитозан-гликолем в сравнении со свободными липосомами

Образец*	Частота колебаний групп, см^{-1}				Интерпретация
	$\text{CH}_2\text{ as}$	$\text{CH}_2\text{ s}$	C=O	PO_2	
Липосомы	2920	2851	1729	1220	гелеобразное состояние
Липосомы:хитозан-гликоль (1:0,5)	2920	2851	1742 1726	1220 1247	взаимодействие только с анионными группами, слабо зависит от основомольного избытка полимера; предварительный нагрев липосом приводит к более существенным сдвигам полос поглощения фосфатной группы
Липосомы:хитозан-гликоль (1:1)	2920	2851	1740, 1729	1220, 1247	
Липосомы:хитозан-гликоль (1:2)	2920	2851	1740	1220 1245	
Липосомы ЖК:хитозан-гликоль (1:0,5)	2920	2851	1742	1222 1245	
Липосомы ЖК:хитозан-гликоль (1:1)	2920	2851	1740	1244 1266	
Липосомы ЖК:хитозан-гликоль (1:2)	2918	2850	1744	1263	

*Липосомы:хитозан-гликоль = 1:Х, где Х – основомольный избыток хитозан-гликоля.

явления основных физико-химических различий получали комплексы липосом с хитозан-гликолем в разных основомольных избытках как с предварительным нагревом липосомальной суспензии до температуры фазового перехода, так и без нагрева (табл. 2).

Установлено, что комплексообразование с ЖК-липосомами приводит к более эффективному взаимодействию с фосфатными группами. Так, в случае двукратного основомольного избытка полимера наблюдается существенное различие между комплексами липосом с предварительным нагревом и без нагрева. Большой сдвиг полосы поглощения фосфатной группы в случае комплекса ЖК-липосом указывает на более эффективное взаимодействие полимера с данной группой.

Следует также отметить изменения в области поглощения ацильных цепей: комплексообразование ЖК-липосом с хитозан-гликолем, взятым в двукратном избытке, приводит к снижению подвижности гидрофобных углеводородных цепей. Данное явление указывает на то, что при предварительном нагреве, вероятно, происходит заглубление цепей полимера в липидный бислой и образуется комплекс, более эффективный, чем в отсутствие нагрева.

Определение состава комплексов. Для определения содержания хитозан-гликоля в комплексе образец центрифугировали в условиях, при

которых несвязанный полимер оставался в растворе, а комплекс выпадал в осадок. Методом ИК-спектроскопии определяли содержание хитозан-гликоля в растворе до центрифугирования и в супернатанте. На ИК-спектре хитозан-гликоля (рис. 1, А) присутствуют несколько узких полос поглощения (например, 1551 и 1455 см⁻¹), интенсивность которых линейно зависит от концентрации хитозан-гликоля (рис. 1, Б).

Обнаружено, что предварительный нагрев обеспечивает более эффективное связывание с увеличением доли полимера в изначальном комплексе (табл. 3). Насыщение происходит при двукратном основомольном избытке полимера. В отсутствие нагревания избыток полимера не влияет на эффективность связывания.

Определение констант диссоциации комплексов липосом и гликоль-хитозана проводили с использованием метода Скетчарда по методике [3]. Уравнение имеет вид

$$P_b/P_f = K \cdot L_0 - K \cdot P_b,$$

где P_b – концентрация связанного полимера, P_f – концентрация свободного полимера, L_0 – концентрация липосом. Известно, что тангенс угла наклона данной прямой численно равен обращенной константе диссоциации комплекса.

Установлено, что без нагрева величина константы диссоциации составляет $3,5 \cdot 10^{-4}$ М, а при

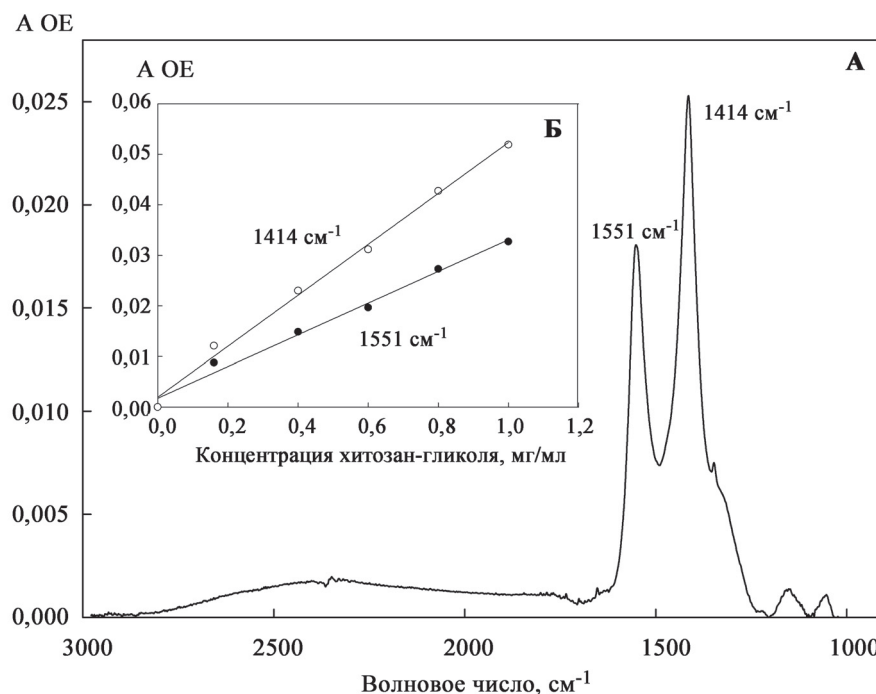


Рис. 1. А – ИК-спектр хитозан-гликоля (3 мг/мл, боратный буферный раствор, рН 9, 22°C); Б – Калибровочные кривые для определения концентрации хитозан-гликоля по интенсивности полос поглощения 1414 и 1551 см⁻¹

Т а б л и ц а 3

Составы комплексов липосомы – гликоль-хитозан (по данным ИК-спектроскопии)

Исходный избыток хитозан-гликоль (осново-моль)	Состав комплекса липосомы:хитозан-гликоль (осново-моль)	Состав комплекса ЖК липосомы:хитозан-гликоль (осново-моль)
1:0,5	1:0,33	1:0,33
1:1	1:0,33	1:0,5
1:2	1:0,33	1:1

нагреве она снижается до $1 \cdot 10^{-5}$ М, т.е. предварительный нагрев позволяет получить более эффективные и прочные комплексы, что согласуется с анализом их структуры. Комплексообразование при нагреве происходит более эффективно, вероятно, за счет большей доступности анионных групп мембраны, нагретой до температуры фазового перехода. Таким образом, варьируя условия образования комплексов, можно получать контейнеры с желаемыми свойствами.

Исследование процесса высвобождения доксорубина из липосомальных систем. Важным является не только образование эффективного комплекса, но и процесс высвобождения содержимого липосомы в разных условиях. Из литературы известно, что в большинстве здоровых клеток рН равен примерно 7,4, в то время как в ряде опухолевых клеток имеет место закисление (за счет нарушения клеточного метаболизма), и рН снижен до 5,5 [6].

Для изучения процесса высвобождения препарата мы выбрали модельное противоопухолевое лекарство доксорубин, обладающее интенсивной красной флуоресценцией. Поскольку при включении доксорубина в липосомы происхо-

дит «тушение» его флуоресценции, за высвобождением препарата можно следить по нарастающему сигналу флуоресценции во внешнем растворе. Установлено, что доксорубин высвобождается из несвязанных в комплекс липосом в течение 20 ч (рН 7,4 и 5,5; 37°C) (рис. 2, А). На высвобождение доксорубина из несвязанных в комплекс липосом рН не оказывает существенного влияния. Иная картина наблюдается в случае комплексов липосом с хитозан-гликолем. Обнаружено, что в течение 60 ч при рН 7,4 доксорубин не высвобождается из комплекса липосомы–хитозан-гликоль. Напротив, при рН 5,5 высвобождение происходит через 25 ч (рис. 2, Б). Такую существенную разницу можно объяснить влиянием H^+ на катионные группы хитозан-гликоля. Поскольку связывание полимера на поверхности анионных липосом происходит за счет электростатических сил взаимодействия между фосфатными группами липидов и аминогруппами хитозана, увеличение концентрации ионов водорода приводит к ослаблению данного взаимодействия. В условиях нейтрального раствора комплекс остается устойчивым, «полимерная шуба», вероятно, препятствует высвобождению доксору-

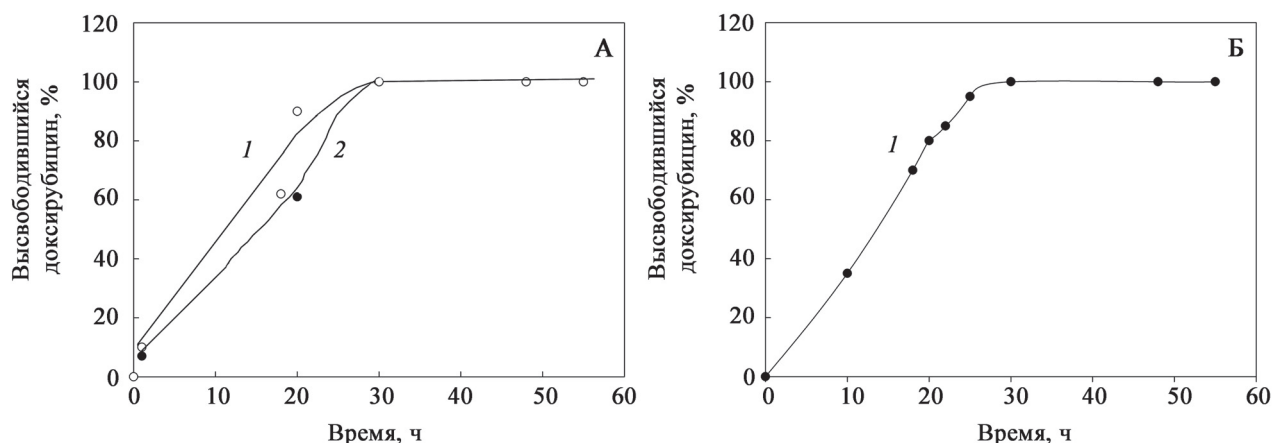


Рис. 2. Высвобождения доксорубина из: А – несвязанных в комплекс липосом при рН 7,4 (1) и 5,5 (2); Б – комплекса липосомы:хитозан-гликоль = 1:1 рН 5,5 (1)

бицина. Очевидно, что комплексообразование с хитозан-гликолем может существенно влиять на высвобождение лекарственного препарата. При нейтральных значениях pH высвобождение значительно заторможено, а в условиях ацидоза в течение 25 ч высвобождается практически весь препарат. Полученные результаты могут служить основой для разработки системы с контролируемым высвобождением лекарственного препарата, чувствительной к изменению среды раствора.

Таким образом, в данной работе продемонстрировано образование эффективного комплекса

анионных липосом с хитозан-гликолем. Сайтами связывания являются фосфатная и карбонильная группы липидов. Предварительный нагрев липосомальной суспензии до температуры фазового перехода липосом позволяет получить более эффективные комплексы и уменьшить константу диссоциации комплекса с $3,4 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ М. Комплексообразование приводит к существенному затормаживанию высвобождения доxorубина из липосом при pH 7,4 и замедляет высвобождение при pH 5,5 по сравнению с высвобождением доxorубина из несвязанных липосом.

Данная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-13-00063 (проведение работ по определению состава и структуры полимеров в комплексных системах с использованием метода ИК-спектроскопии, что необходимо для анализа полимерных микрочастиц, получаемых методом СКФ), программы УМНИК; с использованием оборудования, приобретенного по программе Развития МГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ulrich A.S. // Biosci. Rep. 2002. Vol. 22. P. 129.
2. Deygen I.M., Kudryashova E.V. // Russ. J. Bioorganic Chem. 2014. Vol. 40. P. 547.
3. Deygen I.M., Kudryashova E.V. // Coll. Surf. B. 2016. Vol. 141. P. 36.
4. Moreno M.M et al. // BBA. 2009. Vol. 1788. P. 1296.
5. Yaroslavov, A. A., et al. // Polymer science. 1994. Vol. 36. P. 215.
6. Hsu P.P., Sabatini D.M. // Cell. 2008. Vol. 134. P. 703.

Поступила в редакцию 01.12.15

INFLUENCES OF GLYCOL-CHITOSAN ON FUNCTIONAL AND STRUCTURAL PROPERTIES OF ANIONIC LIPOSOMES

I.M. Deygen, E.V. Kudryashova

(Enzymology Division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University)

In present paper it was demonstrated, that one could apply derivatives of chitosan, namely, glycol-chitosan, in order to produce liposomal containers for doxorubicin. K_{dis} of anionic liposomes–glycol-chitosan complexes were evaluated by FTIR as $3,5 \cdot 10^{-4}$ M and $1 \cdot 10^{-5}$ M, depending on the phase state of liposomes. Significant influence of complex formation on doxorubicin release was found.

Key words: doxorubicin, liposomes, chitosan, FTIR.

Сведения об авторах: Дейген Ирина Михайловна – аспирант химического факультета МГУ (i.m.deygen@enzyme.chem.msu.ru); Кудряшова Елена Вадимовна – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (helena_koudriachova@hotmail.com).