

УДК 577.352.2

ПЭГ-ХИТОЗАН – СТАБИЛИЗИРУЮЩИЙ АГЕНТ ДЛЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ СУСПЕНЗИЙ: ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ И СТЕПЕНИ ПЭГИЛИРОВАНИЯ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА

И.М. Ле-Дейген*, Е.В. Кудряшова

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

Продемонстрирована возможность регуляции физико-химических свойств (стабильность, размер, заряд, устойчивость) липосомальных контейнеров для доставки лекарственных препаратов путем подбора молекулярной массы и степени модификации ПЭГ-хитозана. Обнаружено влияние молекулярной массы и степени модификации хитозана на процесс высвобождения доксорубина из липосомальных контейнеров в зависимости от свойств полимера и pH среды.

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

Список сокращений: КЛ – кардиолипин, ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин, ПЭГ – полиэтиленгликоль.

Несмотря на прогресс в создании новых лекарственных средств, актуальной остается задача создания новых систем доставки активных молекул. К подобным системам предъявляют ряд требований: нетоксичность, биodeградируемость, отсутствие иммунного ответа, замедленное высвобождение карго [1]. Внимание исследователей привлекают липосомы, биосовместимые липидные везикулы [2]. Широкое применение липосом в медицинских целях до сих пор ограничено из-за ряда недостатков, в первую очередь из-за низкой термодинамической стабильности и склонности к агрегации [3]. Разработаны различные подходы, позволяющие повысить стабильность липосом при хранении [4], в частности, использование ПЭГилированных липидов и стабилизирующих оболочек на основе биосовместимых полимеров. Актуальной остается задача выявления закономерностей влияния свойств таких стабилизирующих добавок на структурно-функциональные свойства получаемых комплексов.

Ранее была показана существенная стабилизация липосом за счет комплексообразования с ПЭГ-хитозаном [5].

Цель данной работы состояла в изучении влияния молекулярной массы (М) хитозана (5, 15 и 90 кДа) и степени ПЭГилирования на структурно-функциональные свойства липосом, загруженных модельным лекарственным препаратом доксорубином.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

В работе использовали следующие материалы: кардиолипин (КЛ) динатриевая соль, раствор в хлороформе (25 мг/мл); дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), раствор в хлороформе; яичный лецитин, раствор в хлороформе – препараты фирмы «Avanti Polar Lipids» (США); хитозан с молекулярной массой 5, 15 и 90 кДа; доксорубин гидрохлорид – препараты фирмы «Sigma-Aldrich» (США), а также mPEG-suc-NHS – препарат фирмы «Nanocs» (США).

ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре Фурье «Tensor 27» («Bruker», Германия), оснащенный МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, с термостатом фирмы «Huber» (США). Измерения проводили в термостатируемой ячейке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, BioATR-II, «Bruker», Германия) с использованием кристалла однократного отражения ZnSe, при 22 °С и постоянной скорости продувки системы сухим воздухом аппаратом «Jun-Air» (Германия). На кристалл ячейки НПВО наносили аликвоту (50 мкл) образца, спектр регистрировали трижды в интервале от 4000 до 950 см⁻¹, с разрешением 1 см⁻¹; проводили 70-кратное сканирование и усреднение. Фон регистрировали аналогично. Спектры анализировали с помощью программы Opus 7.0 Bruker.

Определение размеров везикул проводили с помощью системы «Zetasizer Nano S» («Malvern»,

Англия) (4 мВт He–Ne-лазер, 633 нм) в термостабируемой ячейке при 22 °С.

Флуоресцентный анализ. Регистрировали спектр эмиссии при длине волны возбуждения 480 нм в интервале от 490 до 600 нм с помощью прибора «Varian Cary». Определяли интенсивность пика при 590 нм.

Синтез сополимеров ПЭГ-хитозан. Хитозан растворяли в 3%-й уксусной кислоте при интенсивном перемешивании. После получения прозрачного раствора его pH доводили до 6,5 добавлением 5 мМ натрий-фосфатного буфера; финальная концентрация хитозана составила 3 мг/мл. В него по каплям при перемешивании вводили 5–20-кратный молярный избыток раствора монометокси-ПЭГ-N-гидроксисукцинимидилсукцината mPEG-suc-NHS (M = 5 кДа) в DMSO в пересчете на 1 моль дезацелированных аминогрупп хитозана, при этом кислотность раствора доводили до pH 7,5 натрий-фосфатным буфером. Смесь интенсивно перемешивали в течение 1–4 ч. Очистку проводили путем диалитриции с применением фильтров «Amicon Ultra» (США). Полноту очистки контролировали ИК- и УФ-спектроскопией.

Степень модификации хитозана полиэтиленгликолем определяли по числу свободных аминогрупп в сополимере ПЭГ-хитозан по сравнению с исходным препаратом хитозана. Регистрацию кинетических кривых образования окрашенных аддуктов аминогрупп хитозана с тринитробензолсульфокислотой (ТНБС) проводили на УФ-спектрофотометре. В кювету, содержащую 3 мл 0,1 М натрий-боратного буферного раствора (pH 8,5), добавляли 0,05 мл 1 М раствора ТНБС в воде, вносили аликвоту (50 мкл 1–2 мг/мл раствора) сополимера, перемешивали и регистрировали изменение оптического поглощения при 420 нм в течение 60 мин при 22 °С. Кювета сравнения содержала 3 мл того же буфера и 0,05 мл раствора ТНБС. Полученную кинетическую кривую изменения оптического поглощения экстраполировали к начальному моменту и по полученному значению определяли процентное содержание свободных аминогрупп в образце ПЭГ-хитозана; за 100% принимали содержание аминогрупп в немодифицированном хитозане.

Определение степени модификации хитозана ПЭГ методом ИК-спектроскопии проводили по полосе поглощения ПЭГ при 1089 см^{-1} , соответствующей валентным колебаниям С–О–С-связи. В ячейку НПВО ИК-спектрометра помещали 30 мкл раствора образца ПЭГ-хитозана (0,5–2,0 мг/мл). ИК-спектр регистрировали в интервале $4000\text{--}900\text{ см}^{-1}$ и определяли интенсивность поло-

сы поглощения образца на частоте 1089 см^{-1} . Содержание ПЭГ-цепей в препарате хитозана определяли по калибровочному графику (зависимость интенсивности поглощения при 1089 см^{-1} от концентрации ПЭГ для свободного ПЭГ с M = 5 кДа). При этом учитывали вклад фона (собственного поглощения хитозана) при 1089 см^{-1} .

Получение малых моноламеллярных липосом, загруженных доксорубицином. Липосомы получали по методике, описанной в работе [6]. Для получения загруженных доксорубицином липосом в липидную пленку перед диспергированием добавляли раствор доксорубицина в натрий-фосфатном буферном растворе. Свободный доксорубицин отделяли диализом против натрий-фосфатного буферного раствора (Serva MW cut-off 3500) с контролем сохранности липосом.

Получение комплексов липосом с конъюгатами хитозана. К раствору липосом (5 мг/мл) в натрий-фосфатном буферном растворе (pH 7,4) добавляли по каплям при перемешивании раствор полимера в основономольном соотношении липосомы:полимер = 1:7 (насыщающее соотношение было определено ранее в [7]), после чего комплексы инкубировали в течение 1 ч при интенсивном перемешивании.

Исследование кинетики высвобождения доксорубицина. Методом диализа проводили смену буферного раствора липосом: на ацетатный (pH 5,5 для имитации опухолевой клетки). Затем липосомальную суспензию переносили в диализную капсулу, помещали на качалку ($T = 37\text{ °C}$). В течение 50 ч отбирали пробы внешнего раствора и детектировали спектр флуоресценции.

Обсуждение результатов

Синтез и характеристика производных хитозана. Синтез производных хитозана разной молекулярной массы (5, 15 и 90 кДа) проводили путем ацилирования свободных аминогрупп активированным производным полиэтиленгликоля. Подробно синтез изложен в работе [5]. Определение степени модификации проводили методом ИК-спектроскопии Фурье по интенсивности характеристической полосы поглощения –С–О–С-связи в цепях ПЭГ, результаты контролировали классическим методом титрования свободных аминогрупп тринитробензолсульфокислотой (ТНБС). Результаты определения степени модификации полученных в работе образцов ПЭГ-хитозана представлены в табл. 1. Следует отметить хорошую сходимость результатов, полученных двумя методами, при этом результаты ИК-спектроскопии характеризуются меньшей величиной стандартного

Т а б л и ц а 1

Определение степени модификации ПЭГ-хитозана методами ИК-спектроскопии Фурье и титрования свободных аминогрупп ТНБС

Образец	М, кДа	ПЭГ/АГ	Степень модификации, %				Число цепей ПЭГ на молекулу хитозана
			ИК-спектроскопия	SD, $n = 3$	TNBS-титрование	SD, $n = 3$	
ПЭГ-хитозан-90-5	90	2	5,0	0,5	4,0	1,0	12
ПЭГ-хитозан-90-14		4	14,0	0,2	11,0	1,9	33
ПЭГ-хитозан-90-15		5	15,0	0,5	13,0	2,8	36
ПЭГ-хитозан-90-18		6	18,0	0,5	17,0	2,3	43
ПЭГ-хитозан-90-25		10	25,0	0,9	25,0	1,9	60
ПЭГ-хитозан-15-20	15	3	20,0	0,9	19,0	3,3	8
ПЭГ-хитозан-15-22		5	22,0	0,5	22,0	2,3	9
ПЭГ-хитозан-5-15	5	3	15,0	0,4	13,5	1,6	2

отклонения. Вероятно, это связано с тем, что в методе ИК-спектроскопии Фурье напрямую определяется содержание ПЭГ в системе, в то время как титрование свободных аминогрупп ТНБС является косвенным методом и часто осложнено побочными процессами (фоновый гидролиз ТНБС, образование аддуктов с другими функциональными группами, стерические затруднения при образовании окрашенного аддукта при анализе полимеров).

Изучение механизма комплексообразования анионных липосом с производными хитозана. Для изучения молекулярного механизма комплексообразования липосом с ПЭГ-хитозаном и определения сайтов связывания полимера на поверхности мембраны в качестве основного метода исследования использовали метод ИК-спектроскопии, в качестве комплементарного метода применяли метод динамического светорассеяния.

ИК-спектроскопия Фурье в режиме нарушенного полного внутреннего отражения представляется удобным методом для диагностики состояния липидной мембраны [5, 7, 8]. В ИК-спектре липосом обращают на себя внимание ряд интенсивных полос поглощения, по изменениям которых можно судить о влиянии лигандов на структуру липосом. Две полосы поглощения, соответствующие симметричным и асимметричным колебаниям углеводородных связей (2853 ± 5 и 2926 ± 5 см^{-1}) чувствительны к изменениям плотности гидрофобных цепей липидов. Полоса поглощения карбонильной группы $\text{C}=\text{O}$ ($1730\text{--}1750$ см^{-1}) является сенсором взаимодействия на поверхности липид–вода. Полоса погло-

щения асимметричных валентных колебаний фосфатной группы ($1220\text{--}1260$ см^{-1}) чувствительна к взаимодействиям с катионными лигандами.

В случае комплексообразования с сополимерами ПЭГ-хитозана полосы поглощения фосфатной и карбонильной групп претерпевают единообразный высокочастотный сдвиг, указывающий на образование электростатических связей между фосфатными группами липидов на поверхности липосом с аминогруппами хитозана.

Интересно отметить наблюдаемые различия во взаимодействии липосом с производными хитозана малой и средней молекулярной массы (5, 15 кДа) и высокомолекулярного хитозана (90 кДа). Сдвиги полосы поглощения фосфатной группы в случае комплекса липосом с производными высокомолекулярного хитозана более выражены по сравнению с производными хитозана, имеющими молекулярную массу 5 и 15 кДа. Вероятно, это обусловлено способностью более крупных полимерных молекул вызывать латеральную сегрегацию молекул кардиолипина в поверхностном слое липосом. Более того, для комплексов липосом с производными высокомолекулярного хитозана (90 кДа) в ИК-спектре появляется низкочастотный сдвиг полос поглощения ацильных цепей, указывающий на снижение подвижности гидрофобных хвостов. Подобный эффект ранее был обнаружен при взаимодействии анионных липосом с поли-N-этил-4-винилпиридиний бромидом [9]. Положения основных полос поглощения в ИК-спектре липосом и их комплексов с полимерами представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Частота характеристических полос поглощения в ИК-спектрах и средний гидродинамический радиус липосом ДПФХ/КЛ (80/20 по весу) в комплексе производными хитозана в сравнении со свободными липосомами

Образец	Частоты колебаний групп, см ⁻¹				R, нм	Интерпретация
	CH ₂ as	CH ₂ s	C=O	PO ₂		
Липосомы	2920	2851	1739 1723 (плечо)	1225	103	гелеобразное состояние
Липосомы – хитозан (90 кДа)	2919	2850	1730 1742 (плечо) 1726 (плечо)	1244	118	эффективное взаимодействие с анионными группами, снижение подвижности гидрофобной части бислоя
Липосомы – ПЭГ-хитозан-90-5	2919	2850	1731	1240	120	
Липосомы – ПЭГ-хитозан-90-14	2918	2850	1740	1245 1220 (плечо)	118	
Липосомы – ПЭГ-хитозан-90-15	2918	2851	1742	1245 1222 (плечо)	120	
Липосомы – ПЭГ-хитозан-90-18	2918	2849	1741	1244, 1263	120	
Липосомы – ПЭГ-хитозан-90-25	2917	2849	1744	1263	123	
Липосомы – хитозан-15	2920	2851	1743	1230	117	
Липосомы – ПЭГ-хитозан-15-20	2920	2850	1744 1720 (плечо)	1244	119	
Липосомы – ПЭГ-хитозан-15-22	2920	2850	1744	1243	117	
Липосомы – хитозан-15	2920	2850	1741	1232	119	
ПЭГ-хитозан-5-15	2920	2850	1743 1723 (плечо)	1240	119	

Помимо наблюдаемых сдвигов характеристических полос в ИК-спектре липидной мембраны, о комплексообразовании липосом с ПЭГ-хитозаном свидетельствует увеличение среднего размера везикул, как это было определено методом динамического светорассеяния. Так, несвязанные липосомы характеризуются средним радиусом 103 ± 2 нм. Образование комплекса с ПЭГ-хитозаном-90-25 приводит к увеличению радиуса до 120 ± 3 нм, и толщину «полимерной шубы» можно оценить в 20 нм.

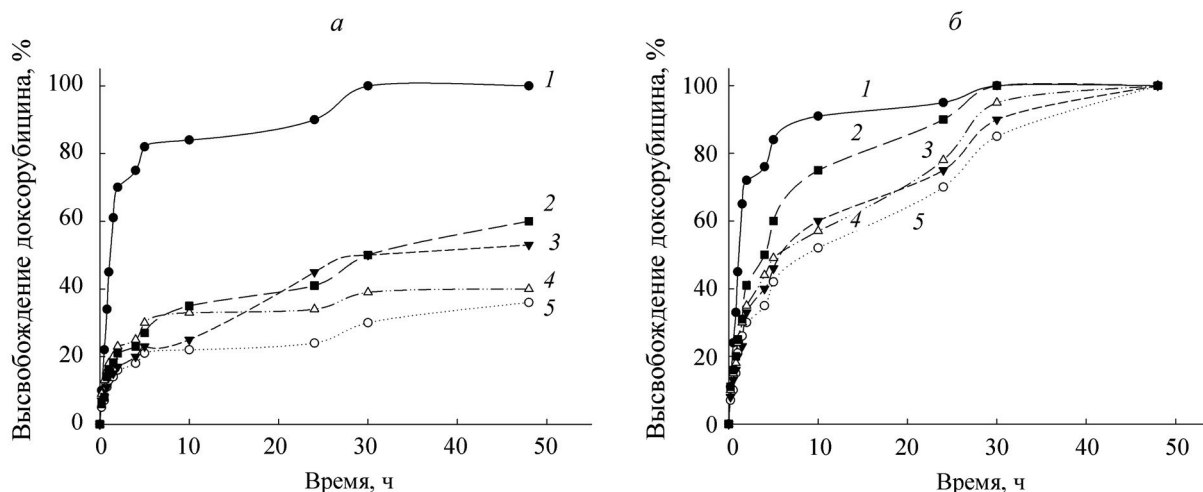
Влияние молекулярной массы и степени модификации ПЭГ-хитозана на высвобождение доксорубина. Исследовано влияние состава полимерной оболочки на процесс высвобождения доксорубина из липосом. Доксорубин – хорошо изученное модельное лекарство, обладающее интенсивной красной флуоресценцией [10]. Метаболизм опухолевых клеток значительно отличается от метаболизма клеток здоровых. Ускоренная пролиферация и нарушение процессов дифференцировки приводят к изменению состава цито-

плазмы. Так, для ряда линий опухолевых клеток обнаружен эффект «закисления», т.е. снижение рН до 5,5 [11]. Поэтому в данной работе был рассмотрен процесс высвобождения доксорубина из липосом в натрий-ацетатном буферном растворе (рН 5,5) в сравнении с натрий-фосфатным буферным раствором (рН 7,4).

Доксорубин в течение 18–20 ч полностью высвобождается из липосом как в нейтральной, так и в кислой среде (рисунок, кривые 1). Полимерная оболочка ПЭГ-хитозана замедляет высвобождение лекарства в нейтральной среде (рисунок, кривые 2–5). В течение 50 ч не достигается полного высвобождения доксорубина из комплексов липосом с производными хитозана. Наиболее выражен этот эффект для комплексов липосом с ПЭГ-хитозаном-15-20 и ПЭГ-хитозаном-90-25 (рисунок, кривые 4–5), т.е. для комплексов, несущих на себе наибольшее число цепей ПЭГ. В случае полимеров с низким содержанием ПЭГ (ПЭГ-хитозан-15-5) снижение скорости высвобождения доксорубина выражен в меньшей степени. Сравнение хода кривых 3 и 4 (рисунок, а), соответствующих комплексам липосом с ПЭГ-хитозаном-15-5) и ПЭГ-хитозаном-15-20, показывает, что на начальном участке кривые идут симбатно, однако спустя 10 ч высвобождение из комплекса с ПЭГ-хитозаном-15-20 практически выходит на плато, в то время как кривая 3 продолжает монотонный рост на участке 10–24 ч, затем она также выходит на плато.

В кислой среде (рисунок, б), напротив, высвобождение всего содержимого из комплексов липосом с ПЭГ-хитозаном осуществляется за 50 ч. Особенно интересен начальный участок

высвобождения (0–10 ч). Контрольный образец – липосомы без полимерной оболочки спустя 10 ч высвобождают практически весь доксорубин (рисунок, б; кривая 1). С небольшим замедлением высвобождает содержимое комплекса липосом с ПЭГ-хитозаном-5-20 (рисунок, б; кривая 2) самым низкомолекулярным полимером. Несмотря на высокую степень модификации, каждая молекула хитозана несет на себе лишь две цепи ПЭГ (табл. 1). Комплексы с ПЭГ-хитозаном-15-5 и ПЭГ-хитозаном-15-20 демонстрируют практически единообразный ход высвобождения (рисунок, б; кривые 3, 4). Медленнее всего содержимое высвобождается из комплекса липосом с ПЭГ-хитозаном-90-25 (рисунок, б; кривая 5). Вероятно, наблюдаемое различие в кинетике высвобождения доксорубина связано с влиянием рН на эффективность электростатических взаимодействий между анионными группами липидов и аминогруппами полимера. В кислых средах аминогруппы хитозана заряжены, что определяет более высокую подвижность полимерных цепей в комплексе с липосомами, процесс высвобождения доксорубина ускоряется относительно нейтральной среды, где полимер склонен образовывать гелеподобную структуру вокруг липосомальной мембраны. В кислой среде, как и в щелочной, степень ПЭГилирования и молекулярная масса хитозана влияют на скорость высвобождения доксорубина: чем больше молекулярная масса хитозана и чем больше степень ПЭГилирования, тем медленнее высвобождается содержимое (рисунок, б). Вероятная причина наблюдаемого эффекта заключается в том, что многоточечное взаимодействие с липосомальной мембраной усиливается при уве-



Высвобождение доксорубина из липосом и их комплексов при рН 7,4 (а) и 5,5 (б): 1 – свободные липосомы, 2 – комплекс липосом с ПЭГ-хитозаном-5-15, 3 – комплекс липосом с ПЭГ-хитозаном-15-5, 4 – комплекс липосом с ПЭГ-хитозаном-15-20, 5 – комплекс липосом с ПЭГ-хитозаном-90-25

личении молекулярной массы хитозана и гидратная оболочка существенно увеличивается в объеме при увеличении содержания ПЭГ в частице.

Полученные результаты могут служить основой для создания стимул-чувствительных липо-

сомальных контейнеров для доставки лекарственных средств, причем представляется возможной регуляция физико-химических свойств контейнера путем подбора молекулярной массы хитозана и степени его модификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petros R.A., DeSimone J.M. // *Nature Rev. Drug. Disc.* 2010. Vol. 9. P. 615.
2. Yingchoncharoen P., Kalinowski D., Richardson D. // *Pharmacol. Rev.* 2016. Vol. 68. P. 701.
3. Ulrich A.S. // *Biosci. Rep.* 2002. Vol. 22. P. 129.
4. Ingvarsson P.T., Yang M., Nielsen H.M., Rantanen J., Foged C. // *Expert Opin Drug Deliv.* 2011. Vol. 8. P. 375.
5. Deygen I.M., Kudryashova E.V. // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2014. Vol. 40. P. 547.
6. Бабицкая С.В., Жукова М.В., Кисель М.А., Кузьмицкий Б.Б., Макович А.Е., Насек В.М., Черноок Н.Н., Шни-
гур В.М. // *Химико-фармацевтический журнал.* 2006. Т. 40. С. 36.
7. Deygen I., Kudryashova E. // *Colloids and Surfaces B.* 2016. Vol. 141. P. 36.
8. Moreno M.M., et al. // *BBA.* 2009. Vol. 1788. P. 1296.
9. A.A. Yaroslavov, A.A. Efimova, A.V. Sybachin // *Polymer Science Series A.* 2009. Vol. 51. P. 638.
10. Pavlov D.N., Dorodnykh T.Y., Zaborova O. V., Melik-Nubarov N.S. // *Polym. Sci. Ser. A.* 2009. Vol. 51. P. 295.
11. Yaroslavov, A.A., et al. // *Polymer science.* 1994. Vol. 36. P. 215.

Поступила в редакцию 23.11.17

PEG-CHITOSAN AS A PERSPECTIVE STABILIZING AGENT FOR LIPOSOMAL SUSPENSION: MOLECULAR WEIGHT AND PEGYLATION DEGREE INFLUENCE ON THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF COMPLEX

I.M. Le-Deygen*, E.V. Kudryashova

(Department of chemical enzymology, Faculty of chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow; *e-mail: i.m.deygen@gmail.com)

The possibility of regulation of physico-chemical properties (stability, size, binding sites) of liposomal containers for drug delivery by selection of molecular weight and the degree of modification of ПЭГ-chitosan has been demonstrated. The effect of the regulation of the release of doxorubicin from liposomal containers depending on the properties of the polymer and pH was demonstrated.

Key words: doxorubicin, liposomes, chitosan, FTIR.

Сведения об авторах: Ле-Дейген Ирина Михайловна – мл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (I.m.deygen@gmail.com); Кудряшова Елена Вадимовна – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (helena_koudriachova@hotmail.com).