


На правах рукописи



Давыдов
Дмитрий Александрович

**КОМПЛЕКСЫ КАТНОННЫХ ПОЛИМЕРОВ С ЛИПИДНЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ:
ПОЛУЧЕНИЕ, ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ**

02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

МОСКВА-2010

Работа выполнена в лаборатории синтеза и изучения свойств полимеров кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Ярослав Александр Анатольевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Штильман Михаил Исаакович
доктор химических наук, профессор
Литмапович Андрей Аркадьевич

Ведущая организация: Государственное общеобразовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная академия тонкой химической технологии имени М.В. Ломоносова» (МИТХТ им. М.В. Ломоносова).

Защита состоится 27 октября 2010 г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.60 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г.Москва, Ленинские горы д.1, стр.3, МГУ имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, Лабораторный корпус «А», кафедра высокомолекулярных соединений, ауд. 501.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан 24 сентября 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.х.н.



Долгова А.А.

20101
21609

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Сферические бислойные липидные везикулы (липосомы) известны в течение более 40 лет. Устойчивый интерес исследователей и практиков к липосомам объясняется рядом соображений: хорошей биосовместимостью липидов, большим разнообразием методов их получения, простотой контроля липидного состава и размера липосом, а также возможностью приготовления смешанных липид/белковых везикул. С помощью липосом оказалось возможным моделировать строение и физико-химические свойства биологических мембран. Это обстоятельство было использовано для анализа механизма взаимодействия клеток с синтетическими водорастворимыми полимерами, в частности, полиэлектролитами.

Принципиальным является вопрос о способности адсорбированных полиэлектролитов мигрировать между липосомами, т.е. об обратимости контакта полиэлектролит-липосома. Ответ на этот вопрос важен как с теоретической точки зрения для количественного описания формирования и поведения полимер-коллоидных комплексов, так и с практической для разработки лекарственных препаратов направленного действия на основе полимеров. Между тем, до последнего времени этот вопрос в литературе практически не обсуждался.

Известно, что адсорбция полиэлектролитов на липосомальной мембране часто сопровождается агрегацией липосом. Это существенно осложняет постановку экспериментов по межлипосомальной миграции макромолекул и интерпретацию полученных результатов. В связи с этим нами было предложено использовать (наряду с традиционными анионными липосомами) два других типа липосом: 1) «гидрофилизированные» анионные, мембрана которых была ковалентно модифицирована цепями полнокислотилена, и 2) трехкомпонентные, состоящие из дивиттер-ионного, анионного и катионного липидов. Такие липосомы не агрегируют в присутствии поликатиона, что открывает путь к экспериментальному изучению перехода макромолекулы поликатиона с одной липосомы на другую.

Цель работы заключалась в изучении межлипосомальной миграции катионных полимеров, в установлении структурно-химических характеристик липосомальных мембран в контакте с поликатионами и в определении токсичности комплексов поликатион-липосома.

В работе исследованы:

а) адсорбция катионных полимеров, кватернизованных производных поли-4-винилпиридина, на поверхности традиционных анионных липосом, сформированных из

фосфатидилхолина (ФХ) и дифосфатидилглицерола (кардиолипина, КЛ²); гидрофилизованных ФХ/КЛ² липосом со встроенным в бислой неионогенным ПАВ – эфиром полиэтиленгликоля и цетилового спирта (Бридж 58); и трехкомпонентных электронейтральных липосом, состоявших из ФХ и взятых в равных количествах КЛ² и дицетилдиметиламмоний бромид (ЦМАБ¹⁴);

б) структурные перестройки в липосомальных мембранах, вызванные адсорбцией поликатиона;

в) миграция адсорбированных катионных макромолекул между липосомами;

г) токсичность комплексов поликатион-липосома, в том числе с участием липосом, наполненных противоопухолевым антибиотиком доксорубицином (Докс), по отношению к клеткам и экспериментальным животным (мышам).

Научная новизна. Продемонстрировано, что адсорбция поликатиона на поверхности анионных гидрофилизованных липосом, модифицированных ковалентно пришитым ПЭГ, сопровождается образованием доменов отрицательно заряженного липида, а также изменением конформации ПЭГ. Впервые показано, что связывание поликатиона с электронейтральными липосомами, содержащими положительно и отрицательно заряженные компоненты в равном мольном соотношении, не сопровождается латеральной сегрегацией липидов. Установлено, что гидрофилизованные и электронейтральные липосомы не образуют агрегатов при связывании с поликатионом. Выявлено, что комплекс поликатион-липосома способен обмениваться макромолекулами: в случае образования агрегатов происходит частичное перераспределение звеньев (сегментов) молекул полимера между липосомами; при отсутствии агрегатов наблюдается миграция адсорбированных макромолекул между индивидуальными липосомами. Впервые показано, что модификация поликатионом поверхности гидрофилизованных липосом позволяет эффективно осуществлять доставку доксорубицина в ядра клеток, обладающих множественной лекарственной устойчивостью.

Практическая значимость. В ходе исследования модельной системы поликатион-липосома получены результаты, имеющие принципиальное значение для понимания механизма взаимодействия синтетических полиэлектролитов с клеточной мембраной. Описанная в работе межлипосомальная миграция поликатиона служит экспериментальным обоснованием поиска и узнавания целевых клеток биологическими активными комплексами с участием синтетических полимеров. Результаты работы и сделанные на их основе выводы позволяют прогнозировать поведение синтетических полимеров на поверхности клетки и реакцию клетки на адсорбированный полимер и должны быть приняты во внимание при разработке смешанных полимер-липосомальных

контейнеров для транспорта биологически активных веществ.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на 45-ом международном микросимпозиуме "Структура и динамика макромолекулярных систем" (Чехия, Прага, 2006), 4-ой международной конференции "Наука о полимерах 21-му веку" (Россия, Москва, 2007), 8-ой международной конференции Julich Soft Matter Days 2008 (Германия, Бонн, 2008), 22-ой международной конференции Европейского общества коллоидной химии и химии поверхности (Польша, Краков, 2008), а также на XIV, XVI и XVII-ой Международных конференциях «Ломоносов 2007, 2009 и 2010» Москва.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатные работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 6 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 111 страницах машинописного текста, содержит 35 рисунков и 4 таблицы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы из 168 ссылок.

Во **введении** дано обоснование актуальности диссертационной работы и указаны ее цели и задачи.

В **литературном обзоре** проанализированы приведенные в литературе данные о структуре липидного бислоя, способах повышения коллоидной стабильности липосом, взаимодействию катионных полимеров с липосомами и структурным перестройкам в липидных мембранах под действием поликатионов. Описаны факторы, оказывающие влияние на проницаемость липидных мембран. Приведены примеры использования липосом в качестве носителей лекарственных препаратов; описаны свойства клеток, обладающих множественной лекарственной устойчивостью.

В **экспериментальной части** описаны объекты и методы исследования. В работе использовали следующие катионные сополимеры (в скобках указаны составы): N-этил-4-винилпиридиний бромид/4-винилпиридин (9,5/0,5), П2, и N-этил-4-винилпиридиний бромид/N-этил-4-винилпиридиний бромид/4-винилпиридин (9/0,5/0,5), П2,16. Состав сополимеров был определен методом ИК спектроскопии. Степень полимеризации обоих поликатионов была равна 600. Концентрация катионных сополимеров приведена в молях кватернизованных групп на литр раствора.

Для получения липосом использовали растворы веществ в хлороформе: цвиттер-ионного ФХ (I), анионного КЛ²⁻ (II), катионного ЦМАБ¹⁺ (III), ПЭГилированного липида (IV) и 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(карбоксихлорофлуоресцеина) (ДОФЭА-

КФ) (V) (рис. 1). В работе все эти соединения с полярной «головкой» и одним или двумя алкильными радикалами объединены термином «липид». Липосомы готовили ультразвуковой обработкой водной суспензии липидов. Мольная доля отрицательно заряженных полярных головок рассчитывалась следующим образом: $\nu(-) = 2[\text{КЛ}^2] / (2[\text{КЛ}^2] + [\text{ЦМАБ}^{1+}] + [\text{ФХ}] + [\text{ПЭГ-липид}])$, мольная доля положительно заряженных групп как $\nu(+)$ = $[\text{ЦМАБ}^{1+}] / (2[\text{КЛ}^2] + [\text{ЦМАБ}^{1+}] + [\text{ФХ}])$ и мольная доля ПЭГилированного липида как $\nu(\text{ПЭГ}) = [\text{ПЭГ-липид}] / (2[\text{КЛ}^2] + [\text{ФХ}] + [\text{ПЭГ-липид}])$. В работе использовали анионные двухкомпонентные ФХ/КЛ²⁻ липосомы с $\nu(-) = 0.2$, анионные трехкомпонентные ФХ/КЛ²⁻/ПЭГ-липид липосомы с $\nu(-) = \nu(\text{ПЭГ}) = 0.2$ и электронейтральные трехкомпонентные ФХ/КЛ²⁻/ЦМАБ¹⁺ липосомы с $\nu(-) = \nu(+)$ = 0.2.

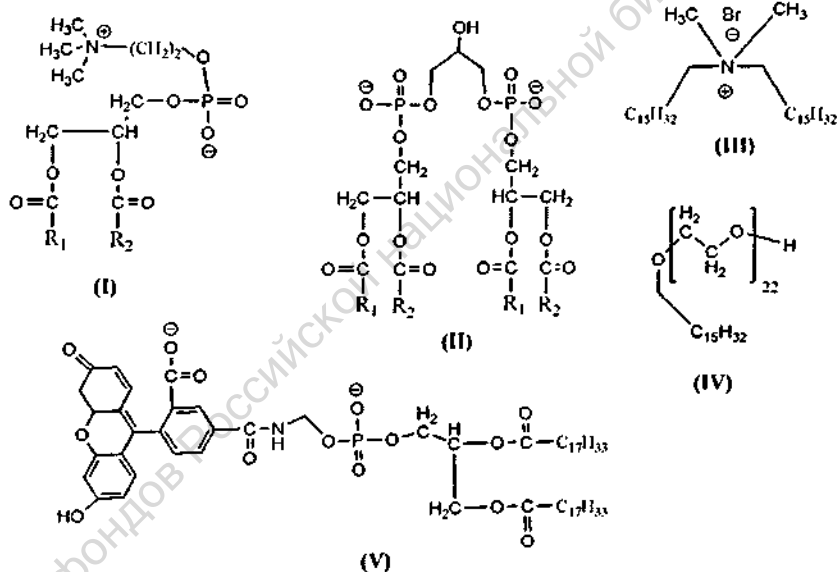


Рисунок 1. Формулы использованных в работе липидов: I – лецитин или фосфатидилхолин (ФХ), II – кардиолипин КЛ²⁻, III – диметилдиметиламмоний бромид (ЦМАБ⁺), IV – Бридж - 58, V - 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфотаноламин-N-(карбоксифлуоресцеина) (ДФЭА-КФ)

Размер (гидродинамический диаметр) малых моноламеллярных липосом колебался от эксперимента к эксперименту, но не выходил за пределы интервала 80-100 нм. Электрофоретическую подвижность (ЭФП) липосом определяли методом лазерного микроэлектрофореза. В работе использовали также методы флуоресцентной, УФ и ИК спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и изотермической титрационной калориметрии (ИТК), кондуктометрии и потенциометрии. Волю для

приготовления растворов очищали двойной перегонкой с последующим последовательным пропусканием через ионообменные, адсорбционные колонки и фильтр для удаления крупных частиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

1. Формирование комплексов катионного полимера с липосомами.

Для регистрации взаимодействия П2 с липосомами был использован метод лазерного микроэлектрофореза. Адсорбция поликатиона сопровождается изменением поверхностного заряда липосом, что отражается на величине их ЭФП. На рис. 2а приведены зависимости ЭФП при добавлении П2 к трем типам использованных в работе липосом: ФХ/КЛ², ФХ/КЛ²/Бридж и ФХ/КЛ²/ЦМАБ¹⁺. Для традиционных ФХ/КЛ² липосом (кривая 1) и гидрофилизированных ФХ/КЛ²/Бридж липосом (кривая 2) добавление П2 вначале приводило к уменьшению ЭФП липосом до нуля, затем происходила перезарядка поверхности частиц и, наконец, ЭФП достигала своего предельного положительного значения. В обоих случаях нейтрализация поверхностного заряда липосом достигалась при $[П2]_{ЭФП=0} = 2,8 \times 10^{-4} М$, что соответствовало концентрации отрицательно заряженного КЛ² в системе.

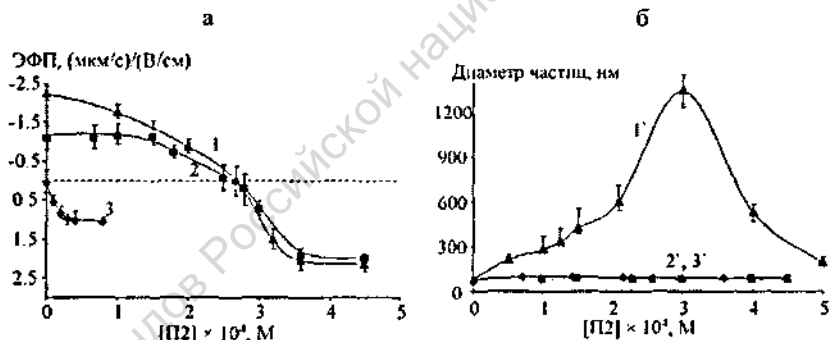


Рисунок 2. Зависимость ЭФП (а) и диаметра (б) частиц комплекса П2-липосома от концентрации П2. ФХ/КЛ² (1 и 1'), ФХ/КЛ²/Бридж (2 и 2') и ФХ/КЛ²/ЦМАБ¹⁺ (3 и 3') липосомы. Суммарная концентрация липидов 1 мг/мл; $[КЛ^{2-}] = [ЦМАБ^{1+}] = 2,8 \times 10^{-4} М$; $10^{-2} М$ боратный буфер, рН 9.2.

Понижение ЭФП исходных ФХ/КЛ²/Бридж липосом по сравнению с двухкомпонентными ФХ/КЛ² липосомами (начальные точки на кривых 1 и 2) было связано с появлением на поверхности мембраны ПЭГ слоя и, как следствие, смещением плоскости скольжения в поверхностном слое липосом вглубь раствора.

Что касается электронейтральных ФХ/КЛ²/ЦМАБ¹⁺ липосом, их заряд сдвигался в положительную область по мере увеличения концентрации П2 и достигал максимального значения +1,2 (мкм/с)/(В/см) при $[П2] = 0,5 \times 10^{-4} М$.

Полученные результаты свидетельствовали о связывании катионного П2 со всеми исследованными липосомами: анионными ФХ/КЛ²⁻ и ФХ/КЛ²⁻/Бридж и электронейтральными ФХ/КЛ²⁻/ЦМАБ¹⁺.

Параллельные измерения размера (гидродинамического диаметра) частиц в суспензиях методом фотонной корреляционной спектроскопии показали наличие агрегатов только в системе «П2 + ФХ/КЛ²⁻ липосомы» (кривая 1' на рис. 2б), в двух других случаях наблюдалось лишь незначительное возрастание размера частиц после добавления П2 (кривые 2' и 3' на рис. 2б). Агрегативная стабильность комплексов П2 с ФХ/КЛ²⁻/Бридж липосомами была обусловлена наличием гидрофильного слоя молекул ПЭГ, который препятствовал пространственному сближению липосом и, как результат, блокировал агрегацию (стерический фактор стабилизации). Стабильность электронейтральных ФХ/КЛ²⁻/ЦМАБ¹⁺ липосом в комплексе с П2 была связана с тем, что адсорбированный поликатион придавал поверхности липосом положительный заряд, препятствовавший развитию агрегации (электростатический фактор стабилизации).

Для оценки эффективности связывания П2 с липосомами были использованы различные подходы. Для системы «П2 + ФХ/КЛ²⁻ липосомы» мы проанализировали состав супернатантов после отделения агрегатов липосом с адсорбированным поликатионом методом центрифугирования. На рис. 3 изображена зависимость концентрации П2 в надосадочной жидкости от его общей концентрации в суспензии. Видно, что поликатион количественно связывался с липосомами вплоть до $[П2]_{max} = 3,5 \times 10^{-4} M$; при больших концентрациях поликатион начинал накапливаться в растворе (кривая 2). Полученное в ходе этого эксперимента значение $[П2]_{max}$ практически совпадало с тем, которое соответствовало достижению предельного положительного значения ЭФП комплекса П2- ФХ/КЛ²⁻ липосомы (ср. данные рис. 2а и рис. 3). При этой концентрации П2 на поверхности липосом формировался электростатический барьер, блокировавший образование новых ионных связей со свободным поликатионом.

Выше упоминалось о том, что ФХ/КЛ²⁻/Бридж липосомы не агрегировали в присутствии П2. Это не позволило нам использовать метод центрифугирования для оценки эффективности связывания поликатиона с гидрофилизированными липосомами. Такую оценку мы сделали, опираясь на результаты электрофоретических экспериментов, а именно, на сходство профилей ЭФП - $[П2]$ зависимостей и совпадение нейтрализующих концентраций П2 для ФХ/КЛ²⁻ и ФХ/КЛ²⁻/Бридж липосом (рис. 2а). Эти факты однозначно указывали на количественное связывание П2 с гидрофилизированными липосомами в том же интервале концентраций поликатиона, в пределах которого

наблюдалось его количественное связывание с традиционными ФХ/КЛ²-липосомами: от 0 до $3,5 \times 10^{-4}$ М.

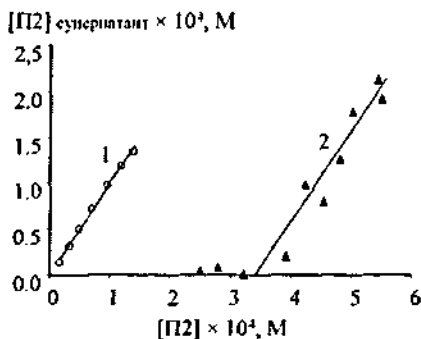


Рисунок 3. Зависимость концентрации П2, не связанного с ФХ/КЛ²-липосомами, от его общей концентрации в суспензии. Кривая 1 калибровка поликатиона без добавления липосом, кривая 2 концентрация поликатиона в супернатанте после центрифугирования комплексов. Суммарная концентрация липидов 1 мг/мл; [КЛ²] = $2,8 \times 10^{-4}$ М; 10^{-2} М боратный буфер, pH 9,2.

В случае электронейтральных ФХ/КЛ²/ЦМАБ¹⁺-липосом данные микроэлектрофореза (кривая 3 на рис. 2а) указывали на то, что связывание П2 с такими липосомами развивалось по крайней мере до $[П2] = 0,5 \times 10^{-4}$ М, однако не позволяли сделать вывод об эффективности взаимодействия, то есть о распределении поликатиона между липосомами и раствором. С целью ответа на этот вопрос были проведены дополнительные эксперименты с использованием метода флуоресценции. Использованный в работе П2 является эффективным тушителем флуоресценции. За его связыванием с липосомами следили по изменению интенсивности флуоресценции меченого липида (ДОФЭА-КФ), встроенного в липосомальную мембрану.

Добавление раствора П2 к суспензиям меченых традиционных ФХ/КЛ²-липосом и гидрофилизированных ФХ/КЛ²/Бридж-липосом приводило к уменьшению относительной интенсивности флуоресценции метки I/I_0 , где I_0 и I — интенсивность флуоресценции метки до и после добавления поликатиона соответственно. Полученные зависимости $I/I_0 - [П2]$ для обоих типов липосом описывались одной кривой, при этом значение I/I_0 линейно уменьшалось с концентрацией П2 и выходило на плато при $[П2] = 1,25 \times 10^{-4}$ М (кривые 1 и 2 на рис. 4а). Линейность зависимости $I/I_0 - [П2]$ означала, что в области $[П2] \leq 1,25 \times 10^{-4}$ М весь добавленный поликатион адсорбировался на поверхности липосом. Выше мы отмечали, что П2 связывался с ФХ/КЛ² и ФХ/КЛ²/Бридж-липосомами в интервале $[П2] \leq 3,5 \times 10^{-4}$ М. Однако результаты флуориметрических экспериментов указывали на существенно меньший интервал концентраций поликатиона, в пределах которого он количественно связывался с обоими типами липосом. Объяснение этому состоит в том, что поликатион, адсорбированный на поверхности меченых анионных липосом, предпочтительно взаимодействовал с отрицательно заряженными флуоресцентно мечеными

липидом. После исчерпания метки П2 продолжал связываться с липосомами за счет формирования солевых связей с молекулами KL^{2-} .

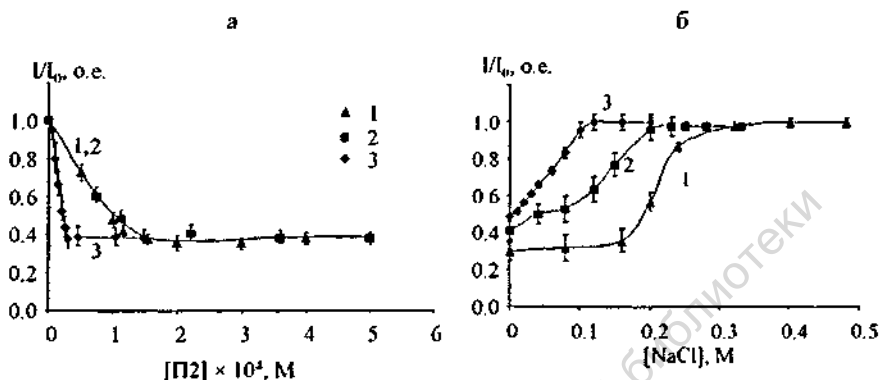


Рисунок 4. Зависимость интенсивности флуоресценции меченых липосом от концентрации П2 (а) и зависимости интенсивности флуоресценции полученных комплексов от концентрации NaCl (б). ФХ/КЛ²⁻ (1 и 1'), ФХ/КЛ²⁻/Бридж (2 и 2') и ФХ/КЛ²⁻/ЦМАБ¹⁺ (3 и 3') липосомами. Суммарная концентрация липидов 1мг/мл, $[\text{P2}] = 2 \times 10^{-4}$ (1' и 2') и $0,25 \times 10^{-4}$ М (3'), 10^{-2} М боратный буфер, pH 9.2.

Аналогично описанному выше добавление возрастающих концентраций П2 к суспензии меченых трехкомпонентных ФХ/КЛ²⁻/ЦМАБ¹⁺ липосом вызывало линейное уменьшение интенсивности флуоресценции метки (кривая 3 на рис. 4а), что отражало количественное связывание полнатопа в интервале $[\text{P2}] \leq 0,25 \times 10^{-4}$ М. Как и для анионных липосом, флуоресценция достигала предельного значения при концентрации П2 меньшей, чем требовалась для достижения максимального положительного значения ЭФП комплекса П2-липосома (ср. кривую 3 на рис. 4а и кривую 3 на рис. 2а). Таким образом, меченый липид играл роль «якоря» и в случае взаимодействия П2 с мечеными ФХ/КЛ²⁻/ЦМАБ¹⁺ липосомами.

Добавление раствора NaCl к суспензиям комплексов П2 со всеми типами меченых липосом приводило к восстановлению интенсивности флуоресценции до исходного уровня (рис. 4б), что отражало диссоциацию комплексов на исходные компоненты – липосомы и молекулы П2. Однако полное восстановление флуоресценции происходило при разных концентрациях добавленной соли: 0,12 М NaCl для комплексов П2 с ФХ/КЛ²⁻/ЦМАБ¹⁺ липосомами, 0,2 М NaCl для комплексов П2 с ФХ/КЛ²⁻/Бридж липосомами и 0,32 М NaCl для комплексов П2 с ФХ/КЛ²⁻ липосомами. Мы видим, что наиболее устойчивыми к действию соли оказались традиционные липосомы, сформированные из анионного и нейтрального липидов. Модификация мембраны гидрофильным

компонентом (Бридж 58) или катионным липидом приводила к потере устойчивости комплексов липосом с поликатионом в водно-солевых средах.

Таким образом, на основании полученных данных можно утверждать, что П2 адсорбируется на поверхность липосом, что сопровождается агрегацией для традиционных ФХКЛ²-липосом. Введение третьего компонента Бридж-58 или ЦМАБ⁺ привело с одной стороны к повышению агрегативной устойчивости липосом, а с другой снизило стабильность комплексов в водно-солевых средах.

2. Структурные перестройки в липосомальных мембранах под действием адсорбированного поликатиона.

Известно, что адсорбция катионных полимеров на поверхности анионных липосом сопровождается перераспределением липидов в липосомальной мембране. В настоящей работе за микрофазовым разделением в липосомальных мембранах под действием П2 следили с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Температура фазового перехода ФХ липосом лежит ниже 5°C, то есть вне температурных пределов традиционных микрокалориметров. Поэтому для калориметрических экспериментов ФХ заменяли на синтетический нейтральный ДПФХ с температурой фазового перехода $T_{\phi} = 41,4^{\circ}\text{C}$.

Калориметрическая кривая (спектр ДСК) для ДПФХ липосом приведена на рис. 5 (кривая 1). Добавление КЛ² к ДПФХ делало фазовый переход более широким с максимумом при $T_{\phi} = 39,1^{\circ}\text{C}$ (кривая 2). Наличие одного максимума и симметричная форма кривой плавления указывали на равномерное распределение обоих компонентов, КЛ² и ДПФХ, в пределах каждой стороны липосомальной мембраны и между ними. Добавление П2 к суспензии КЛ²/ДПФХ липосом делало пик плавления более узким и сдвигало его в область более высоких температур (кривые 3-5). При $[\text{П2}] = 3,5 \times 10^{-4}\text{M}$ на кривой регистрировался пик с максимумом при $T_{\phi} = 41,4^{\circ}\text{C}$ (кривая 5), положение которого на температурной шкале не менялось при дальнейшем увеличении концентрации поликатиона. Таким образом, адсорбция П2 формировала в смешанной ДПФХ/КЛ²-мембране области, состоявшие только из ДПФХ, в результате количественного выделения анионного КЛ² в отдельные кластеры при связывании с П2. Кластеры КЛ² плавилась при температуре ниже 5°C и поэтому не регистрировались с помощью использованной нами калориметрической аппаратуры.

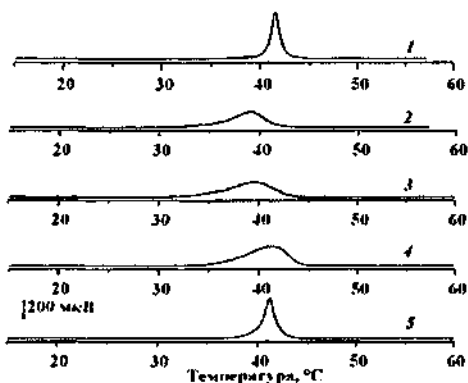


Рисунок 5. Калориметрические кривые для ДПФХ (1) и ДПФХ/КЛ² (2-5) липосом. Суммарная концентрация липидов 1 мг/мл; [П2] = 0 (2), 1×10⁻⁴ (3), 2×10⁻⁴ (4) и 3,5×10⁻⁴М (5); 10⁻²М боратный буфер, рН 9,2.

Микрофазовое разделение липидов в мембране продолжалось вплоть до [П2] = 3,5×10⁻⁴М, которая соответствовала предельному насыщению мембраны липосом адсорбированным поликатионом (ср. с кривой на рис. 3).

Спектры ДСК для бинарной системы ДПФХ/Бридж-58 с различным содержанием Бридж приведены на рис. 6а. При невысоком содержании Бридж ($\nu(\text{ПЭГ}) \leq 0,2$) его встраивание в липосомальную мембрану сопровождалось уменьшением площади пика и его смещением в область низких температур (кривые 2 и 3). Однако последующее повышение доли Бридж до 30 мол.% приводило к заметному уширению и сдвигу вправо пика плавления. Иными словами, бислой с $\nu(\text{ПЭГ}) = 0,3$ становился более тугоплавким, чем бислой с меньшим содержанием Бридж.

Опираясь на литературные данные о структуре липидных бислоев со встроеными ПЭГилированными компонентами, можно следующим образом интерпретировать результаты калориметрических экспериментов. При $\nu(\text{ПЭГ}) \leq 0,2$ ПЭГ фрагменты молекул Бридж принимают конформацию «плаща» и/или «гриба» (рис. 6б-А и 6б-Б). Латеральное отталкивание ПЭГ фрагментов сопровождается уменьшением плотности гидрофобной части бислоя и понижением температуры фазового перехода липосом. При повышении доли Бридж в мембране до 30 мол.% ПЭГ фрагменты приобретают конформацию «щетка» (рис. 6б-В), плотность гидрофобной части бислоя повышается, и температура фазового перехода возрастает.

В спектре плавления трехкомпонентных гидрофилизующих ДПФХ/КЛ²/Бридж липосом с $\nu(-) = \nu(\text{ПЭГ}) = 0,2$ видны два пика с максимумами при 36,4 и 40,3°C, сопоставимые с пиками плавления двух фаз: ДПФХ/КЛ² с $\nu(-) = 0,2$ и ДПФХ/Бридж с $\nu(\text{ПЭГ}) = 0,2$ соответственно (кривая 1 на рис.7). Добавление П2 в концентрации

$3,5 \times 10^{-4} \text{M}$, которая обеспечивала электростатическое связывание всех молекул KЛ^{2-} , приводило к существенным изменениям в спектре ДСК: в нем появлялись три пика

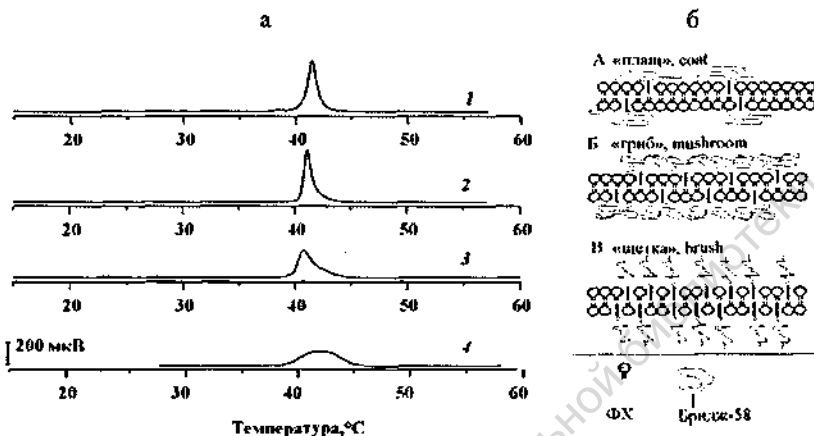


Рисунок 6. Спектры ДСК для ДПФХ/Бридж липосом (а) и строение липидного бислоя при различной концентрации ПЭГилированного компонента (схематическое представление) (б). $v(\text{ПЭГ}) = 0$ (1), 0,1 (2), 0,2 (3) и 0,3 (4). Суммарная концентрация липидов 1 мг/мл; 10^{-2}M боратный буфер, pH 9,2.

при 39,1, 40,8 и 43,0°C (кривая 2). Первый отражал плавление бинарных ДПФХ/ KЛ^{2-} областей с небольшой долей KЛ^{2-} , второй – областей с преимущественным содержанием ДПФХ и третий – ДПФХ/Бридж областей с долей Бридж близкой к 30 мол.%. Основная часть молекул KЛ^{2-} , связанная в комплексе с П2, плавилась при температуре ниже 5°C. Таким образом, связывание П2 с гидрофилизованными ФХ/ KЛ^{2-} /Бридж липосомами, как и в случае традиционных ФХ/ KЛ^{2-} липосом, сопровождалось микрофазовым разделением компонентов в мембране с образованием доменов, обогащенных KЛ^{2-} .

Трехкомпонентные электронейтральные ДПФХ/ KЛ^{2-} /ЦМАБ⁺ липосомы с $v(-) = v(+)$ = 0,2 характеризовались широким фазовым переходом в интервале от 28 до 43°C (кривая 3 на рис. 7). Разложение полученной калориметрической кривой на составляющие показало, что она представляла собой суперпозицию двух кривых с максимумами при 35,2 и 41,4°C. Такая форма спектра указывала на существование в смешанной ДПФХ/ KЛ^{2-} /ЦМАБ⁺ мембране двух микрофаз. Первая с пиком при 41,5°C состояла преимущественно из молекул нейтрального ДПФХ. Другая микрофаза, по-видимому, представляла собой набор областей (доменов) с разным соотношением анионного KЛ^{2-} и катионного ЦМАБ⁺ липидов (возможно, с добавлением некоторого количества нейтрального ДПФХ).

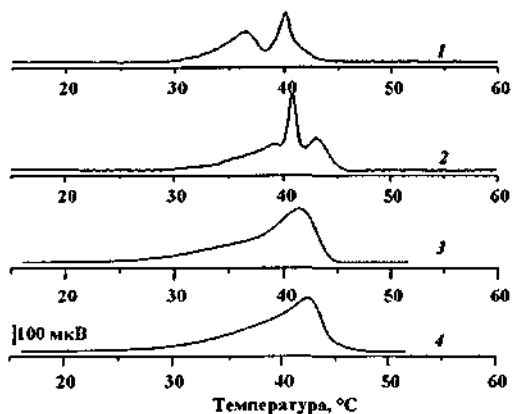


Рисунок 7. Спектры ДСК для ФХ/КЛ²/Бридж липосом (1), их комплекса с ПЭ (2), ДПФХ/КЛ²/ЦМАБ⁺ липосом (3) и их комплекса с ПЭ (4). Суммарная концентрация липидов 1 мг/мл; [ПЭ] = $3,5 \times 10^{-4} M$ (2); $1,5 \times 10^{-4} M$ (4); $10^{-1} M$ боратный буфер, pH 9,2.

Последующее добавление раствора ПЭ к суспензии ДПФХ/КЛ²/ЦМАБ⁺ липосом практически не влияло на форму их спектра ДСК (кривая 4). Иными словами, связывание ПЭ не вызывало фазового разделения в мембране трехкомпонентных электронейтральных липосом. Причина этого заключается в следующем. Концентрирование анионных молекул КЛ² вблизи адсорбированного поликатиона (если бы такое имело место) должно было приводить к вытеснению катионных молекул ЦМАБ⁺ в отдельные домены. Такая реорганизация билayers сопровождается заметными энтропийными и энергетическими потерями, которые нельзя компенсировать энтропийным выигрышем от появления в растворе малых противоионов в результате адсорбции катионной макромолекулы на анионной липосоме. Поэтому взаимодействие поликатиона с ДПФХ/КЛ²/ЦМАБ⁺ липосомами развивается как его адсорбция на поверхности с фиксированным положением отрицательных и положительных зарядов.

Таким образом, адсорбция поликатиона на поверхность липосом сопровождалась микрофазовым разделением компонентов мембраны только в случае двух типов липосом бинарных (ФХ/КЛ²) и «гидрофилизированных» (ФХ/КЛ²/Бридж), причем в последнем случае процесс сопровождался переходом молекул ПЭГ из конформации «платца» в состояние «щетка». Структурные изменения для обоих типов анионных липосом происходили вплоть до достижения концентрации ПЭ = $3,5 \times 10^{-4} M$, что соответствует полноте связывания полимера. Для нейтральных трехкомпонентных липосом адсорбция поликатиона не приводит к заметным структурным перестройкам в липидной мембране.

3. Межлипосомальная миграция поликатиона.

Миграционные эксперименты выполнялись по следующей схеме: к сформированным комплексам липосом с поликатионом добавляли новые порции липосом и следили за изменением флуоресценции метки, встроенной в липосомальную мембрану,

и/или ЭФП частиц в системе. Ключевым условием для однозначной интерпретации полученных результатов было количественное связывание поликатиона с липосомами как на стадии формирования комплекса, так и в ходе перераспределения поликатиона между липосомами. Выше мы показали, что в 1 мг/мл суспензиях анионных ФХ/КЛ²⁻ и ФХ/КЛ²⁻/Бридж липосом полное связывание поликатиона наблюдалось при [П2] ≤ 3,5×10⁻⁴М, в суспензии электронейтральных ФХ/КЛ²⁻/ЦМАБ⁺ липосом той же концентрации при [П2] ≤ 0,5×10⁻⁴М.

Мы начали с простейшей системы, включавшей П2 и двухкомпонентные анионные ФХ/КЛ²⁻ липосомы. Как следует из данных, представленных на рис. 2б, формирование комплексов в такой системе сопровождалось агрегацией липосом. Возникает вопрос: происходит ли миграция молекул П2 между липосомами в таких агрегатах? Ответ на это вопрос был получен с помощью метода флуоресценции.

К меченым ФХ/КЛ²⁻ липосомам был добавлен поликатион, что привело к адсорбции П2 на липосомальной мембране, тушению флуоресценции метки и агрегации липосом. Затем к суспензии комплекса были добавлены не содержащие метку ФХ/КЛ²⁻ липосомы, и через 10 минут после смешения была измерена интенсивность флуоресценции в системе. Результаты для различных концентраций немеченых ФХ/КЛ²⁻ липосом представлены на рис. 8 (кривая 1). Видно, что по мере увеличения концентрации немеченых ФХ/КЛ²⁻ липосом интенсивность флуоресценции метки увеличивалась, достигая предельного значения при эквивальном соотношении липидов, введенных в систему с мечеными и немечеными липосомами.

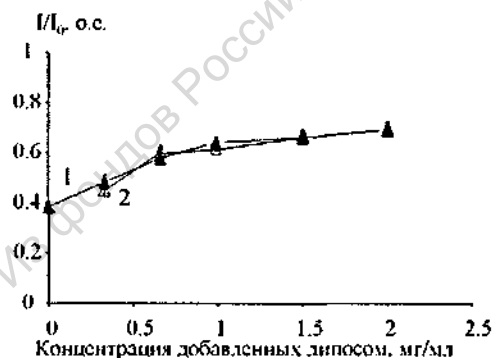


Рисунок 8. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации добавленных липосом в трехкомпонентной системе, содержащей П2, а также меченые и немеченые ФХ/КЛ²⁻ липосомы. Кривая 1 получена добавлением немеченых липосом к комплексу П2 с мечеными липосомами. Кривая 2 получена добавлением меченых липосом к комплексу П2 с немечеными липосомами. [П2]=1×10⁻⁴М, 10⁻¹М боратный буфер, рН 9,2.

После этого мы повторили эксперимент, однако изменили последовательность смешения компонентов на обратную: меченые ФХ/КЛ²⁻ липосомы были добавлены к предварительно сформированному комплексу П2 с немечеными ФХ/КЛ²⁻ липосомами. На рис. 8 (кривая 2) представлена зависимость интенсивности флуоресценции,

установившаяся в системе спустя 10 минут после смешения компонентов. Во всех случаях интенсивность флуоресценции оказывалась ниже таковой для исходных меченых ФХ/КЛ² липосом, что однозначно указывало на переход части звеньев поликатиона с немеченых липосом на меченые. Важно отметить, что уровень флуоресценции, который достигался при обратном смешении компонентов, практически совпадал с результатами, полученными при прямом их смешении (кривые 1 и 2 на рис. 8), то есть не зависел от способа приготовления конечной трехкомпонентной системы.

Вместе с тем присутствие в системе довольно крупных агрегатов (размер которых в несколько раз превышал размер исходных липосом) не позволяло связать тушение флуоресценции с миграцией макромолекул поликатиона как целого между отдельными липосомами. Мы могли лишь констатировать, что включенные в агрегаты липосомы обменивались более или менее протяженными участками (сегментами) адсорбированных молекул П2.

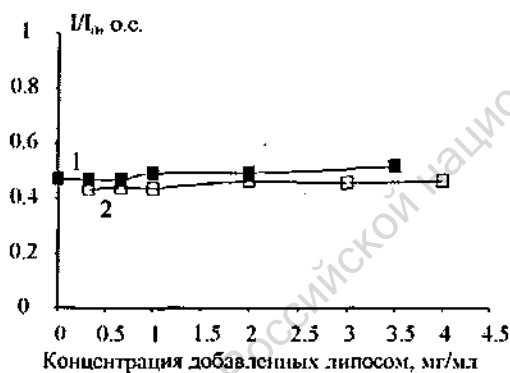


Рисунок 9. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации добавленных липосом в трехкомпонентной системе, содержащей П2, а также меченые и немеченые ФХ/КЛ²/Бридж липосомы. Кривая 1 получена добавлением немеченых липосом к комплексу П2 с мечеными липосомами. Кривая 2 получена добавлением меченых липосом к комплексу П2 с немечеными липосомами. [П2] = 1×10^{-4} М, 10^{-2} М боратный буфер, рН 9,2

В отличие от ФХ/КЛ² липосом гидрофилизированные ФХ/КЛ²/Бридж липосомы не агрегировали при взаимодействии с П2 (см. рис. 26). Для контроля миграции молекул П2 между гидрофилизированными липосомами был использован метод флуоресценции. К суспензии меченых ФХ/КЛ²/Бридж липосом был добавлен П2 в концентрации 10^{-4} М, что гарантировало исчерпывающее связывание П2. Затем к полученной суспензии были добавлены возрастающие количества немеченых ФХ/КЛ²/Бридж липосом. Однако это не вызвало возгорания флуоресценции в системе (кривая 1 рис. 9). В следующей серии экспериментов был использован обратный порядок смешения компонентов. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации немеченых липосом представлена кривой 2 на том же рисунке. Примечательно, что она практически совпадает с кривой 1, описывающей изменение интенсивности флуоресценции при прямом смешении компонентов. При всех соотношениях компонентов – как при прямом, так и при обратном

их смешении – размер частиц в системе лишь незначительно превышал размер исходных липосом.

На первый взгляд полученные результаты указывают на одностороннюю миграцию молекул П2 в суспензии гидрофилизированных липосом: с меченых ФХ/КЛ²/Бридж липосом на немеченые. Однако причина столь высокого сродства поликатиона к меченым липосомам не выглядит очевидной, особенно если принять во внимание отсутствие такого сродства по отношению к двухкомпонентным меченым ФХ/КЛ² липосомам. Для прояснения ситуации мы провели миграционные эксперименты с использованием метода микроэлектрофореза.

В 1 мг/мл суспензию меченых ФХ/КЛ²/Бридж липосом с ЭФП = -1,2 (мкм/с)/(В/см) был введен П2 в концентрации 3×10^{-4} М, что привело к формированию комплекса П2-липосома с ЭФП = +0,6 (мкм/с)/(В/см). Затем к суспензии комплекса были добавлены немеченые липосомы в концентрации 1 мг/мл, при этом ЭФП частиц в системе изменялась до -0,75 (мкм/с)/(В/см). Размер частиц в ходе эксперимента лишь незначительно превышал размер исходных ФХ/КЛ²/Бридж липосом. Полученные результаты свидетельствовали о переходе адсорбированных макромолекул поликатиона с меченых гидрофилизированных липосом на немеченые.

Несоответствие результатов флуоресцентных и электрофоретических экспериментов можно объяснить следующим образом. Бридж 58 является амфифильным соединением с одним алкильным радикалом и объемной полярной головкой, представленной макромолекулами ПЭГ. Встраивание Бриджа в липидную мембрану должно приводить к заметному уменьшению плотности упаковки алкильных цепей в бислой и повышению скорости обменных процессов в мембранах, в том числе, и скорости межлипосомальной миграции липидов. Поэтому можно предположить, что макромолекулы П2 могут перемещаться между липосомами, будучи связанными электростатическими связями в комплексе с анионными компонентами мембраны: КЛ² и ДОФЭА-КФ (см. химические формулы на рис. 1). Такой способ миграции П2 не приводит к изменению интенсивности флуоресценции ДОФЭА-КФ, но сопровождается изменением ЭФП частиц в системе. И то, и другое, действительно, наблюдается в эксперименте.

Способность адсорбированного П2 мигрировать между электронейтральными ФХ/КЛ²/ЦМАБ¹⁺ липосомами была исследована методом флуоресценции по описанной выше методике с той разницей, что концентрация поликатиона была взята равной $2,5 \times 10^{-5}$ М. На рис. 10 приведены результаты миграционного эксперимента для прямого и обратного порядка смешения реагентов (кривая 1 и 2, соответственно). Видно, что интенсивность флуоресценции возрастала по мере увеличения концентрации немеченых

липосом, при этом оба способа смешения приводили к одинаковым результатам. Эти факты, а также отсутствие агрегатов в полимер-липосомальной суспензии указывали на то, что макромолекулы П2 перераспределялись между всеми индивидуальными (неагрегированными) липосомами.

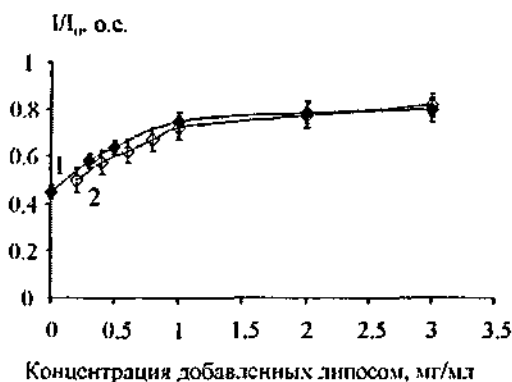


Рисунок 10. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации добавленных липосом в трехкомпонентной системе, содержащей П2, а также меченые и немеченые ФХКЛ⁺/ЦМАБ⁺ липосомы. Кривая 1 получена добавлением немеченых липосом к комплексу П2 с мечеными липосомами. Кривая 2 получена добавлением меченых липосом к комплексу П2 с немечеными липосомами. [П2] = $2,5 \times 10^{-3}$ М, 10^{-3} М боратный буфер, pH 9,2

Итак, по результатам проведенных экспериментов можно утверждать, что поликатион способен перемещаться с одной липосомы на другую. Если процесс развивается в агрегатах, то перераспределяются звенья макромолекулы, в случае стерически стабилизированных липосом происходит перемещение целых макромолекул, связанных в комплексе с мечеными липидами. Для трехкомпонентных электронейтральных липосом происходит миграция полимера в виде отдельных молекул.

4. Токсичность комплексов поликатион-липосома по отношению к клеткам и экспериментальным животным.

Липосомы представляют собой важную категорию наноразмерных систем, широко используемых для инкапсулирования и последующего высвобождения лекарственных веществ. Нами предложено формировать комплексы анионных липосом с катионными частицами для повышения эффективности доставки в клетки инкапсулированных в липосомы лекарств. Ожидалось, что положительный заряд, привнесенный адсорбированным поликатионом, будет способствовать повышению сродства комплекса липосома-поликатион к отрицательно заряженной клеточной мембране.

В качестве первого шага мы исследовали цитотоксичность липосом и их комплексов с поликатионом (для последних в настоящей работе используется термин «нанокapsуль»). Начиная с 90-х годов прошлого столетия наибольшее распространение в качестве липосомальных контейнеров лекарственных веществ получили ПЭГилированные липосомы. Учитывая это обстоятельство, нами были приготовлены липосомы, в мембрану

которых был встроены ПЭГилированный липид, диолеоилфосфатаноламин с ковалентно связанным ПЭГ (ДОФЭА-ПЭГ). Мольная доля ПЭГилированного липида в мембране $v(\text{ПЭГ})$ составляла 0,2. Методами микроэлектрофореза и флуоресценции было показано, что содержащие ДОФЭА-ПЭГ анионные липосомы адсорбируют П2 с той же эффективностью, как это делают описанные выше гидрофилизированные катионные липосомы со встроенным Бридж 58.

Вместе с тем выше мы показали, что в водно-солевых растворах наблюдается диссоциация комплексов П2 с ПЭГилированными липосомами; при физиологических значениях концентрации соли в окружающем растворе (0,15 М NaCl) доля диссоциированных солевых связей поликатион-липосома составляет примерно 60% (см. рис. 4б, кривая 2'). Из литературы известно, что модификация поликатиона боковыми гидрофобными группами повышает стабильность комплексов катионных полимеров с анионными липосомами в водно-солевых средах. Следуя этому подходу, был приготовлен комплекс поликатиона, несущего боковые цетильные группы (П2,16), с ФХ/КЛ²/ДОФЭА-ПЭГ липосомами, который не агрегировал и сохранял стабильность в 0,15 М растворе NaCl. ФХ/КЛ²/ДОФЭА-ПЭГ липосомы с $v(-) = v(\text{ПЭГ}) = 0.2$ и их комплексы с П2,16 были использованы в биологических экспериментах.

Для определения цитотоксичности липосом и нанокapsул (их комплексов с П2,16) 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. 11 представлены зависимости доли выживших клеток линии карциномы молочной железы, обладающей множественной лекарственной устойчивостью (MCF7/R), от концентрации добавленного реагента, в качестве которого выступали липосомы (1), нанокapsулы разного состава (2-4) и катионный П2,16 (5).

Как следует из представленных на рисунке данных, максимально толерантная доза (МТД) реагентов, т.е. их концентрация, при которой наблюдалось 100%-ное выживание клеток, составляла 1 мг/мл для липосом и 0,01 мг/мл для поликатиона. Цитотоксичность нанокapsул не зависела от их состава и была близка к токсичности исходных липосом. Таким образом, иммобилизация катионного полимера на поверхности анионных липосом

не приводила к увеличению их токсического воздействия на клетки с МЛУ.

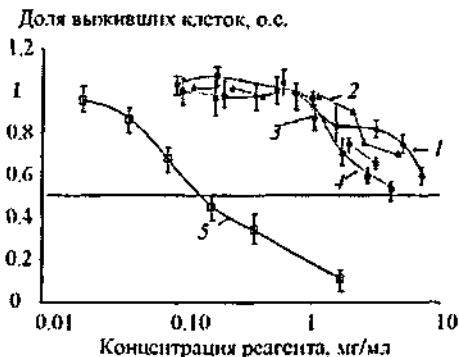


Рисунок 11. Выживаемость клеток линии аденокарциномы молочной железы человека, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (MCF7/R), в присутствии липосом (1), комплексов П2,16-липосома (2-4) и П2,16 (5); $[П2,16] \approx 1,5 \times 10^4$ (2), 3×10^4 (3) и 4×10^4 М (4) в расчете на 1 мг/мл липосом.

Липосомы, нагруженные противоопухолевым антибиотиком доксорубицином (Докс), получали по стандартной методике, суть которой состояла в следующем. В водном растворе Докс способен равновесно переходить из положительно заряженной и растворимой формы в незаряженную и нерастворимую при изменении pH среды от 7 до 4. При попадании Докс в липосомы, внутренний водный объем которых содержит раствор с pH 4, происходит локальное концентрирование лекарства и резкое уменьшение интенсивности его флуоресценции. Контролируя интенсивность флуоресценции Докс, можно не только оценивать эффективность инкапсулирования препарата (долю проникшего в липосомы Докс), но и следить за кинетикой выхода лекарства из липосом в окружающий раствор или внутриклеточное пространство.

Используя описанный подход, мы показали, что загрузка Докс в исходные липосомы происходила за время смешения компонентов (липосом и лекарства). Модификация липосом катионным П2,16 снижала скорость мембранного транспорта Докс, при этом максимальная загрузка достигалась через 20 минут после добавления Докс к суспензии комплекса и мало зависела от количества связанного с липосомами поликатиона (рис. 12). Существенно, что модификация липосомальной мембраны поликатионом заметно снижала скорость спонтанного вытекания Докс из липосом во внешний раствор: уровень загрузки липосом Докс сохранялся по крайней мере в течение 7 дней.

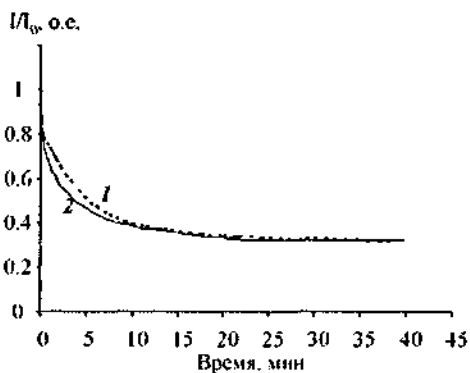


Рисунок 12. Зависимость интенсивности флуоресценции Докс от времени после его добавления в суспензию комплекса П2,16 с ФХКЛ²/ДОФА-ПЭГ липосомами. Суммарная концентрация липидов 1 мг/мл; [П2,16] = $1,5 \times 10^{-4}$ (Кривая 1) и 3×10^{-4} М (Кривая 2); 10^{-2} М фосфатный буфер, pH 7,2.

В экспериментах по слиянию липосом и полимер-липосомных нанокапсул с клетками концентрации реагентов поддерживались близкими их МТД и для всех проб концентрация липидов составляла 1 мг/мл. Липосомы и нанокапсулы заполняли Докс. Для экспериментов использовали клетки линии MCF7/R. Слияние контролировали с помощью метода конфокальной лазерной микроскопии; к закрепленным на дне чашки Петри клеткам с раствором сыворотки вводили пробы липосом или нанокапсул с одинаковым содержанием Докс.

Добавление к клеткам липосом, заполненных Докс, практически не приводило к появлению яркой флуоресценции (рис. 13, 1). Замена липосомальных контейнеров на содержавшие Докс нанокапсулы сопровождалась появлением флуоресценции на поверхности клеток. Этот эффект усиливался по мере увеличения количества адсорбированного на липосомальной мембране поликатиона (рис. 13, 2, 3). Нанокапсулы с суммарным положительным поверхностным зарядом обеспечивали проникновение Докс в ядра клеток (рис. 13, 4). Таким образом, только положительно заряженные комплексы поликатион-липосома позволяли эффективно доставлять Докс в ядра клеток с МЛУ.

Для исследования токсического действия полимер-липидных нанокапсул на животных была использована следующая схема. 42 мыши были разделены на 7 групп по 6 животных в каждой группе.

Готовили 7 мг/мл суспензию липосом (образец 1) и комплексов П2,16-липосомы, которые получали смешением 7 мг/мл суспензии липосом и растворов П2,16 в концентрации $7 \times 4,5 \times 10^{-4}$ М (образец 2) и $7 \times 3,15 \times 10^{-3}$ М (образец 3). Такие концентрации поликатиона обеспечивали перезарядку липосомальной мембраны: она приобретала положительный заряд. Затем готовили липосомы и их комплексы с П2,16 тех же составов, максимально заполненные Докс (образцы 4, 5 и 6).



Рисунок 13. Флуоресцентные микрофотографии клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека с МЛУ (MCF7/R) после добавления наполненных Докс липосом (1) и комплексов П2,16-липосома (2-4). Суммарная концентрация липидов 1 мг/мл; [П2,16] = $1,5 \times 10^{-6}$ (2), 3×10^{-6} (3) и 4×10^{-6} М (4).

По 500 мкл образцов 1, 2 и 3 однократно внутривенно вводили животным из 1, 2 и 3 групп соответственно. Наполненные Докс наноконтейнеры (образцы 4, 5 и 6) однократно внутривенно вводили животным из 4, 5 и 6 групп соответственно (по 500 мкл на мыш). Количество введенных препаратов соответствовало МТД доксорубина, определенного на мышках. Животным из последней ~ седьмой (контрольной) группы препараты не вводили.

Животные наблюдались в течение 1 месяца после введения препаратов. Никаких видимых признаков ухудшения их состояния отмечено не было. Таким образом, гидрофобизованный поликатион, П2,16, липосомы и положительно заряженные полимер-липидные нанокapsулы, в том числе заполненные доксорубином, показали отсутствие токсичности в указанных дозах по отношению к экспериментальным животным (мышам).

ВЫВОДЫ.

1. Показано, что катионный полимер (кватернизованный поли-4-винилпиридин) количественно связывается с тремя типами липосом: 1) традиционными, сформированными из цвиттер-ионного ФХ и анионного $КЛ^{2-}$; 2) гидрофилизованными ФХ/ $КЛ^{2-}$ липосомами со встроенными в бислой ПЭГилированными липидами и 3) трехкомпонентными электронейтральными липосомами, состоявшими из ФХ и взятых в равных количествах $КЛ^{2-}$ и катионного ЦМАБ¹⁺. Комплексообразование поликатиона с традиционными ФХ/ $КЛ^{2-}$ липосомами сопровождается их агрегацией, в то время как гидрофилизованные и трехкомпонентные электронейтральные липосомы не образуют агрегатов при связывании с поликатионом.

2. Установлено, что адсорбция поликатиона на поверхности анионных (традиционных и ПЭГилированных) липосом вызывает микрофазовое разделение компонентов в мембране с образованием доменов, обогащенных $КЛ^{2-}$. В отличие от этого, взаимодействие того же поликатиона с трехкомпонентными электронейтральными липосомами развивается как адсорбция на поверхности с фиксированным положением отрицательных и положительных зарядов и не сопровождается латеральной сегрегацией липидов.

3. Обнаружено, что внутри агрегатов, сформированных ФХ/ $КЛ^{2-}$ липосомами и молекулами поликатиона, происходит частичное перераспределение звеньев (сегментов) макромолекул между липосомами. Адсорбированные макромолекулы способны мигрировать между индивидуальными (неагрегированными) ФХ/ $КЛ^{2-}$ /ЦМАБ¹⁺ липосомами. В системе с участием ПЭГилированных липосом молекулы поликатиона перемещаются между липосомами, будучи связанными электростатическими связями в комплексе с анионными компонентами мембраны.

4. Показано, что уровень цитотоксичности комплексов поликатион-ПЭГилированная липосома близок к таковой для исходных липосом. Полученные комплексы характеризуются низким уровнем токсичности по отношению к экспериментальным животным (мышам).

5. Комплексы поликатион-ПЭГилированная липосома с суммарным положительным поверхностным зарядом обеспечивают эффективное проникновение в клетки противоопухолевого антибиотика доксорубина.

Основные результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:

1. Д. А. Давыдов, А. А. Рахнянская, В. И. Орлов, А. В. Бычкова, А. Л. Коварский, А. А. Ярославов. Комплексы анионных липосом с катионным полимером: состав, строение и свойства. //Высокомолек. Соед. Сер. А. 2010. Т. 52. № 7. с. 1090-1101.
2. Dmitry A. Davydov, Ekaterina G. Yaroslavova, Anna A. Rakhnyanskaya, Anna A. Efimova, Yury A. Ermakov, Fredric M. Menger, Alexander A. Yaroslavov. Polymer Migration among Phospholipid Liposomes. //Langmuir. 2009. V. 25. I. 23. p. 13528-13533.
3. Д.А. Давыдов, Е.Г. Ярославова, А.А. Ефимова, А.А. Ярославов. Миграция катионного полимера между липидными везикулами. //Коллоидный журнал. 2008. Т. 70. №6. с. 1-8.
4. D.A.Davydov, A.A.Efimova, A.A.Yaroslavov, F.M.Menger. Binding of polyelectrolytes to liposomes with embedded conventional and Gemini surfactants. // 45TH Microsymposium structure and dynamics of self-organized macromolecular systems 2006. Prague. Czech. Book of Abstract. p. 81.
5. Д.А.Давыдов, А.А.Ефимова, А.А. Ярославов. Взаимодействие полиэлектролитов со смешанными бислойными везикулами, сформированными из природных липидов и синтетических поверхностно активных веществ. //Тезисы докладов Четвертой Всероссийской Каргинской Конференции «Наука о полимерах 21-му веку». Москва. 2007. Т.2. с. 380
6. Д.А.Давыдов, А.А.Ефимова, А.А. Ярославов. Миграция молекул поликатиона между бислойными липидными везикулами. //Тезисы докладов XIV Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов – 2007». Москва. 2007. с. 96
7. D.A.Davydov, A.A.Rakhnyanskaya, N.S.Melik-Nubarov, A.A.Yaroslavov. Composition and properties of liposomes covered with synthetic polyelectrolytes. //Jülich Soft Matter Days 2008. Bonn. Germany. Book of Abstract. p. 85.
8. D.A.Davydov, E.G.Yaroslavova, A.A.Rakhnyanskaya, A.A.Yaroslavov Dynamic properties of liposome-polyelectrolyte complexes. //22nd Conference of the European Colloid and Interface Society 2008. Cracow. Poland. Book of Abstract. p. 168
9. Д.А.Давыдов, П.В. Горелкин, Н.В. Яминский, А.А. Ярославов. Изучение формирования трехкомпонентных липидных бислоев на слюде методом атомно-силовой микроскопии. //Тезисы докладов Второй международной конференции «Современные достижения бионаноскопии». Москва. 2008 . с. 21.

Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

Подписано в печать 22.09.2010
Формат 60×88 1/16. Объем 1.0 п.л.
Тираж 100 экз. Заказ № 1024
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119991 г.Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к. А-102

Из фондов Российской национальной библиотеки

2010 А
21609

10-21609

Из фондов Российской национальной библиотеки