

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

МОСКВА-2014

Работа выполнена в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова на химическом факультете (кафедра высокомолекулярных соединений, лаборатория полимеризационных процессов).

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Ярославов Александр Анатольевич

Официальные оппоненты:

Штильман Михаил Исаакович, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева» (РХТУ), руководитель учебно-научного центра «Биоматериалы»

Литманович Андрей Аркадьевич, доктор химических наук, Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский автомобильно-дорожный институт (государственный технический университет)» (МАДИ), профессор кафедры Химия

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования **Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова**

Защита состоится 24 декабря 2014 г. в 15 часов 00 минут 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 Фундаментальной библиотеке Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова и на сайте Химического факультета www.chem.msu.ru.

Автореферат разослан _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.х.н.



Долгова Алла Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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 ёмкость 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 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.

Цель работы состояла в исследовании электростатической адсорбции анионных липосом на поверхности полимерных микросфер, содержащих привитые поликатионные цепи, в изучении физико-химических характеристик адсорбированных липосом и в определении устойчивости полученных комплексов полимерная микросфера/липосома в водно-солевом растворе.

Научная новизна работы.

В работе впервые исследована адсорбция анионных липосом на поверхности полимерных микросфер с привитыми поликатионными цепями («сферических поликатионных щёток»). Впервые получены мультилипосомальные комплексы с заданным соотношением инкапсулированных в липосомах веществ. Впервые получены комплексы поликатионных щёток и анионных липосом со встроенным в мембрану липидоподобным амфифильным соединением, которое способно изменять свою конформацию при изменении

pH окружающего раствора. Впервые продемонстрировано, что адсорбированные липосомы высвобождают инкапсулированное вещество при повышении кислотности раствора и скорость выхода вещества из мультилипосомальных комплексов в несколько раз превышает скорость его выхода из индивидуальных (не связанных в комплекс) липосом. Выявлена роль привитых поликатионных цепей в сохранении нативной (неразрушенной) структуры адсорбированных липосом.

Практическая значимость работы. Разработан способ электростатической иммобилизации анионных липосом на поверхности полимерных микросфер с привитыми катионными макромолекулами, позволяющий концентрировать в небольшом объеме несколько десятков липосомальных контейнеров с различными наполнителями. Иммобилизованные липосомы устойчивы в нейтральных и слабощелочных растворах, но быстро высвобождают инкапсулированное вещество при попадании в слабокислую среду. Предложен способ создания новых эффективных мультилипосомальных контейнеров, что может быть использовано для инкапсулирования и контролируемого высвобождения биологически активных (лекарственных) веществ.

Личный вклад автора. Автору принадлежит решающая роль на всех этапах исследования – от постановки задачи, планирования и проведения экспериментов до обсуждения и оформления результатов.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2011» и «Ломоносов-2013», Москва, Россия; Байройтском полимерном симпозиуме «BPS'11», Байройт, Германия (2011); VI Всероссийской конференции по химии среди студентов и аспирантов «Менделеев-2012», Санкт-Петербург, Россия (2012); Австрийско-словенском полимерном симпозиуме «ASPM'13», Блед, Словения (2013).

Публикации. Основные результаты работы изложены в 10 печатных работах, из них 1 статья в журнале, который включен в перечень ВАК РФ российских рецензируемых научных журналов для опубликования основных научных результатов диссертации, 3 статьи в журналах, индексируемых Web of Science, и 6 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Объём и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (136 наименований). Работа изложена на 100 страницах, содержит 33 рисунка, 1 таблицу.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **обзоре литературы** суммированы основные свойства и качества, которыми должны обладать носители для доставки биологически активных веществ. Описаны способы получения, строение и свойства липосом, иммобилизация липосом на твердой поверхности, структура липидных мембран в комплексе с катионными полимерами, стабильность комплексов поликатион/липосома в водно-солевом растворе и их цитотоксичность.

В **экспериментальной части** представлено описание объектов и методов исследования. Для получения липосом использовали этанольные растворы **анионных** дифосфатидилглицерина (кардиолипина, KL^{2-}) и фосфатидилсерина (FC^{1-}), **цвиттер-ионных** (электронейтральных) диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) и дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), и **флуоресцентно меченых** липидов: дипальмитоил-фосфатидилэтанолamina, меченного флуоресцеинизотиоцианатом (ДПФЭ-ФИТЦ), и 1,2-диолеил-глицеро-3-фосфоэтанолamin-N-(лиссамин сульфородамин Б) (ДОФЭ-СР). Липосомы готовили ультразвуковой обработкой водной суспензии смеси липидов, доля отрицательно заряженных полярных «головок» (v) варьировалась от 0 до 0.54. Размер липосом (гидродинамический диаметр) находился в интервале 40-60 нм.

Сферические поликатионные щётки (СК+) были синтезированы, охарактеризованы и предоставлены профессором М. Баллауффом из Университета г. Байройта, Германия. Средняя степень полимеризации привитых цепей составляла 110, на каждой щётке располагалось около 500 поликатионных цепей, размер (гидродинамический диаметр) щёток был равен 300 нм. Концентрация СК+ приведена в молях кватернизованных звеньев в литре раствора, [СК+].

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

Результаты и обсуждение

1. Комплексы поликатионных щёток с анионными липосомами

1.1. Комплексы с участием $KL^{2-}/\Phi X$ липосом

Схематическое изображение поликатионной щётки представлено на **рис. 1**. 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.

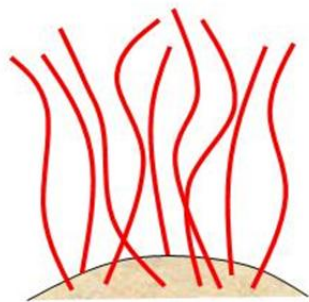


Рисунок 1.
Схематическое изображение полимерной микросферы с привитыми поликатионными цепями (поликатионной щётки).

На **рис. 2** представлены зависимости концентрации липосом в супернатанте от общей концентрации липосом в системе. Видно, что все липосомы количественно связываются с СК⁺ вплоть до концентрации $L_{пред}$ (мг/мл), выше которой липосомы начинают появляться в растворе. Величина $L_{пред}$ зависит от состава липосом и уменьшается по мере возрастания доли анионного липида в липосомальной мембране. Полученные результаты позволили рассчитать предельное количество липосом, адсорбированных на одной поликатионной щётке, N .¹

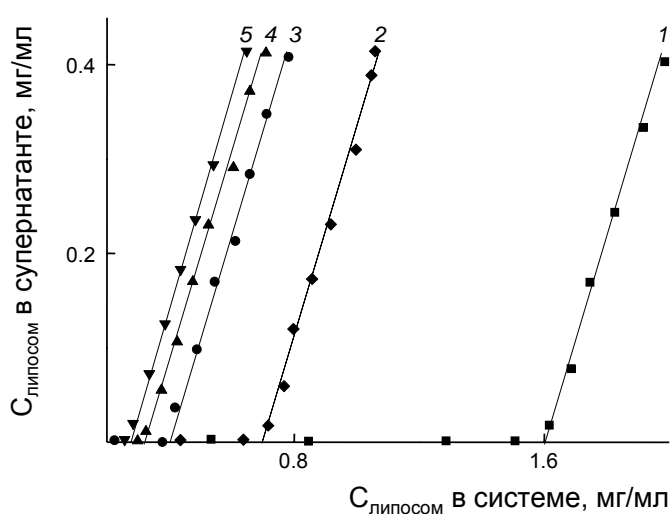


Рисунок 2.
Зависимость концентрации КЛ²⁻/ФХ липосом в надосадочной жидкости от общей концентрации липосом в системе. Доля заряженного липида в мембране, $v = 0.05$ (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4), 0.4 (5); $[СК^+] = 1 \times 10^{-4}$ осново-моль/л; 10^{-2} М боратный буфер, рН 9.2; 20°C.

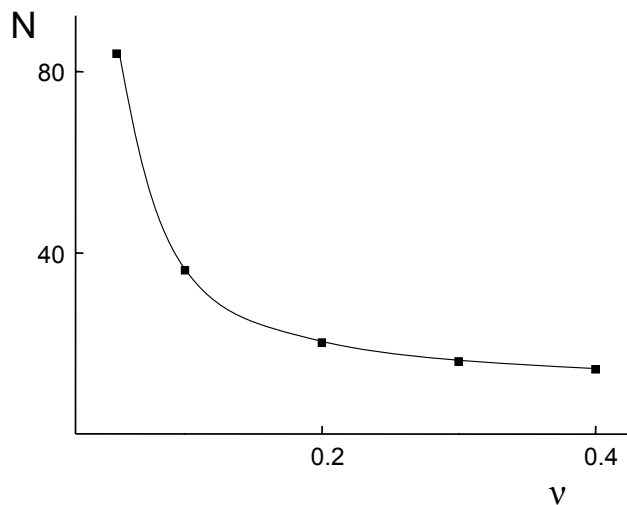


Рисунок 3.
Зависимость количества (N) КЛ²⁻/ФХ липосом, связанных с одной СК⁺, от доли заряженного липида в мембране (v). 10^{-2} М боратный буфер, рН 9.2; 20°C.

Зависимость N от доли анионного липида в мембране v имеет нелинейный характер (**рис.3**): величина N резко уменьшается от 80 до 40 при увеличении v от 0.05 до 0.1 и

¹ Sybachin, A.V. Complexation of anionic liposomes with spherical polycationic brushes / A.V. Sybachin, M. Ballauff, E. Kesselman, J. Schmidt, Y. Talmon, L. Tsarkova, F. M. Menger, A.A. Yaroslavov // Langmuir – 2011 - V. 27 – P. 5310–5315

становится равной 15 при $\nu = 0.4$.

Принципиальный вопрос касается стабильности комплексов к диссоциации на составляющие компоненты – СК⁺ и липосомы в водно-солевых средах. Катионные полимеры являются эффективными тушителями флуоресценции. 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 приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции метки (**рис. 4**). Последующее добавление раствора соли (NaCl) оказывает различный эффект в зависимости от содержания анионного липида в адсорбированных липосомах. Установлено, что комплексы липосом с $\nu = 0.05$ полностью диссоциируют при $[\text{NaCl}] = 0.15 \text{ M}$, комплексы липосом с $\nu = 0.1$ при $[\text{NaCl}] = 0.25 \text{ M}$, в то время как липосомы с $\nu \geq 0.2$ формируют комплексы, которые не диссоциируют в растворах с концентрацией соли до 1.2 M (**рис. 5**).

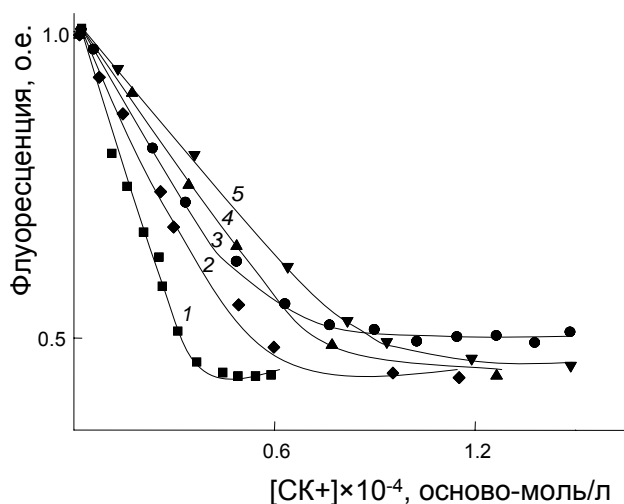


Рисунок 4. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции в системе КЛ²⁻/ФХ липосомы-СК⁺ от концентрации добавленных СК⁺. $\nu = 0.05$ (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4), 0.4 (5); 10^{-2} M боратный буфер, pH 9.2; 20 °C.

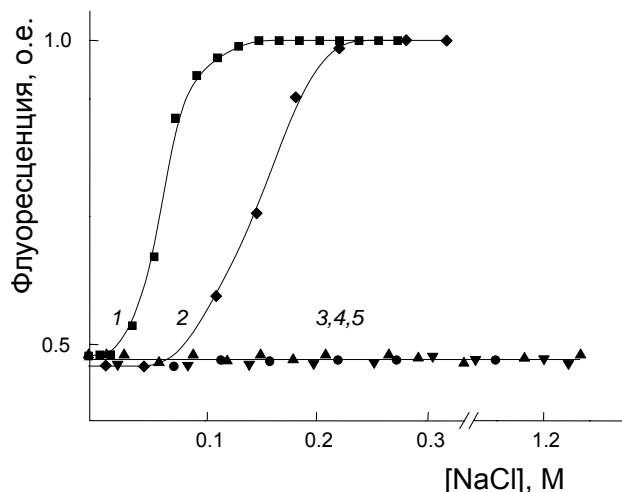


Рисунок 5. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции в системе КЛ²⁻/ФХ липосомы-СК⁺ от концентрации добавленной соли NaCl. $\nu = 0.05$ (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4), 0.4 (5); концентрация липосом 1 мг/мл; $[\text{КЛ}^{2-}]/[\text{СК}^+] = 2/3$; 10^{-2} M боратный буфер, pH 9.2; 20 °C.

Необратимое связывание липосом с СК⁺ могло быть результатом встраивания фрагментов привитых поликатионных цепей в липосомальные мембраны. Такое встраивание должно сопровождаться образованием дефектов в липидном бислое и вытеканием водного содержимого из липосом в окружающий раствор. Целостность ФХ/КЛ²⁻ липосом в комплексе с СК⁺ анализировали методом кондуктометрии, используя липосомы, внутренний водный объём которых был заполнен 1 M 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 влияет на электропроводность системы (рис. 6, кривые 1-4), в то время как добавление липосом с $v = 0.4$ приводит к возрастанию электропроводности (кривая 5). Иными словами, после связывания с СК+ целостность липосом с $v \leq 0.3$ сохраняется, увеличение доли анионного липида до $v = 0.4$ сопровождается появлением дефектов, через которые происходит вытекание раствора NaCl.

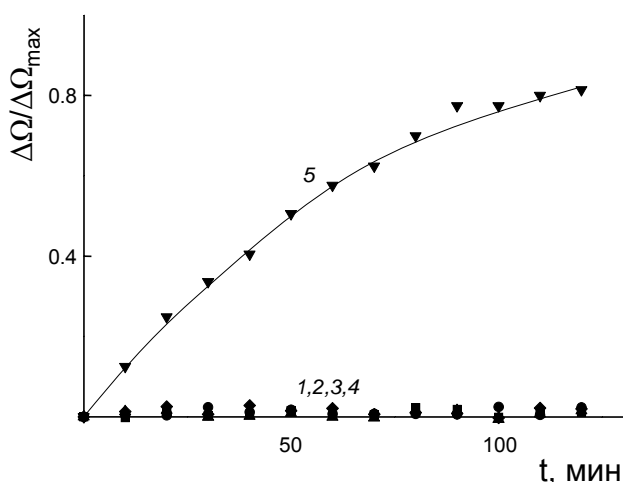


Рисунок 6.

Зависимость относительной электропроводности ($\Delta\Omega/\Delta\Omega_{\text{макс}}$) КЛ²⁻/ФХ липосомы-СК+ суспензии от времени. $v = 0.05$ (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4), 0.4 (5). Общая концентрация липидов 1 мг/мл; [КЛ²⁻]/[СК+] = 2/3; 10⁻³ М боратный буфер, pH 9.2; 20 °С.

Для сравнения мы добавили ФХ/КЛ²⁻ липосомы, заполненные раствором NaCl, к суспензии 100 нм полимерных микросфер без привитых поликатионных цепей. В этом эксперименте были использованы «традиционные» микросферы с катионными группами на поверхности. Добавление липосом с $v = 0.1$ к суспензии таких микросфер сопровождалось уменьшением заряда последних, что указывало на связывание липосом с поверхностью микросфер. Однако одновременно 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 целостности липосом, адсорбированных 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.

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. 7а** показана типичная микрофотография поликатионной щётки в водно-солевом буферном растворе; привитые поликатионные цепи видны на этом рисунке без дополнительного контрастирования. Электронная микрофотография липосом (**рис. 7б**) подтверждает их монослойную структуру; полученный этим методом средний размер липосом (50 ± 10 нм) согласуется с приведёнными выше данными динамического светорассеяния. Частицы комплекса СК+/липосома изображены на **рис. 7в**. Каждая частица состоит из одной поликатионной щётки, окруженной несколькими липосомами. Видно, что сферическая форма липосом (то есть целостность липосом) после их связывания со щётками сохраняется.

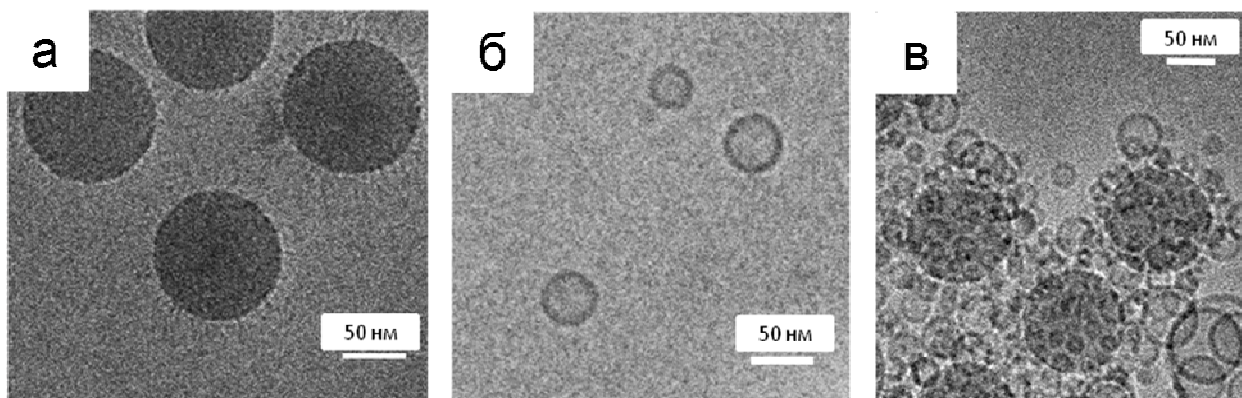


Рисунок 7.

Крио-ТЭМ изображения СК+ (а), ФХ/КЛ²⁻ липосом (б) и комплекса липосома-СК+ (в). Для приготовления образцов использованы 1.5 мг/мл суспензия СК+ (а), 0.1 мг/мл суспензия липосом (б) и смешанная суспензия, содержащая 1.5 мг /мл СК+ и 0.1 мг/мл липосом (в).

1.2. Комплексы с участием ФС¹⁻/ФХ липосом

Ранее было показано, что целостность анионных липосом в комплексе с линейными катионными полимерами определяется геометрической формой анионного липида².

Для выяснения влияния формы анионного липида на целостность липосом, адсорбированных на поверхности полимерных микросфер с привитыми поликатионными цепями, были использованы липосомы, заполненные 1 М раствором NaCl. Липосомы с различным содержанием «симметричного» ФС¹⁻ добавляли к суспензии поликатионных щёток. Как видно из **рис. 8**, соль не вытекает из липосом с $v \leq 0.5$ (кривые 1-5); последующее

² Efimova A., Sybachin A., Yaroslavov A. Effect of anionic-lipid-molecule geometry on the structure and properties of liposome-polycation complexes // Polymer Science - Series C. – 2011. – V. 53, № 1. – P. 18.

увеличение доли анионного липида приводит к быстрому возрастанию электропроводности (кривая 6), что свидетельствует о формировании дефектов в липосомальной мембране.

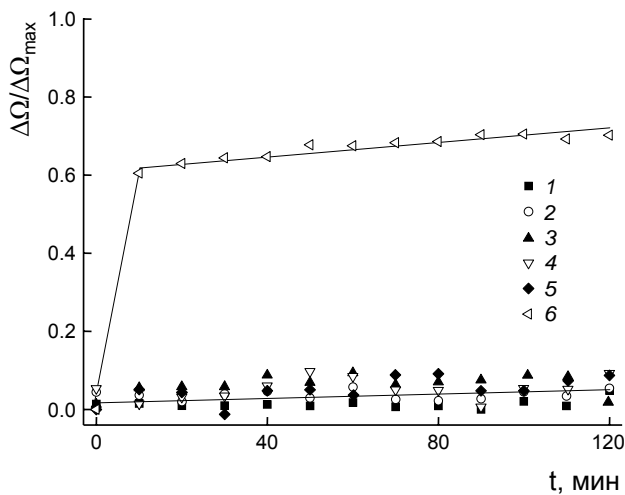


Рисунок 8.

Зависимость относительной электропроводности ($\Delta\Omega/\Delta\Omega_{\text{макс}}$) суспензии комплекса СК+/липосома $\text{ФС}^{1-}/\text{ФХ}$ 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; $[\text{СК}^+] \times 10^{-4}$ 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.

Рис. 9 отражает тушение флуоресценции ФИТЦ-меченых $\text{ФС}^{1-}/\text{ФХ}$ липосом с различным содержанием анионного липида при их связывании с СК+. Как видно из **рис. 10**, добавление раствора соли к суспензиям комплексов СК+/липосома сопровождается восстановлением флуоресценции до исходного уровня при условии, что мольная доля ФС^{1-} в липосомах не превышает 0.5 (кривые 1-5). Комплексы липосом с большим содержанием ФС^{1-} не диссоциируют на исходные компоненты при добавлении соли (кривая 6). Полученные результаты коррелируют с данными о целостности липосом в комплексах (**рис. 8**): формирование дефектов в мембранах адсорбированных липосом делает их связывание со щётками необратимым.

Все полученные комплексы сохраняют устойчивость в физиологическом растворе с $[\text{NaCl}] = 0.15$ М (**рис. 10**). Было определено предельное количество липосом, способных адсорбироваться на одной поликатионной щётке: 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 сохранить адсорбционную ёмкость щёток по анионным липосомам и одновременно расширить интервал составов липосом, формирующих стабильные электростатические комплексы с СК+. Последнее может быть принципиально для создания мультилипосомальных контейнеров с контролируемой скоростью выхода различных лекарств.

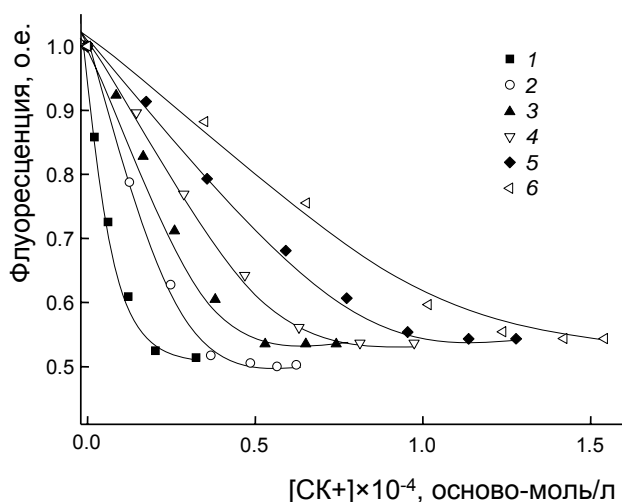


Рисунок 9.

Зависимость относительной интенсивности флуоресценции в системе СК⁺/меченые липосомы ФС¹⁻/ФХ от концентрации СК⁺. $\nu = 0.1$ (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, рН 7.0; 20 °С.

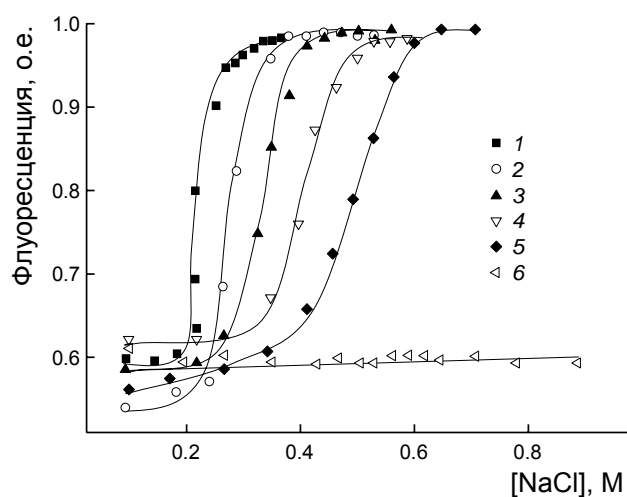


Рисунок 10.

Зависимость относительной интенсивности флуоресценции комплекса СК⁺/меченые липосомы ФС¹⁻/ФХ от концентрации NaCl. $\nu = 0.1$ (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, рН 7.0; 20 °С.

2. Структурные перестройки в мембранах адсорбированных липосом

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). Структурные перестройки в мембранах анионных липосом, связанных в комплекс с поликатионными щётками, изучали, используя методы лазерного микроэлектрофореза и дифференциальной сканирующей калориметрии.

Первый из этих методов отражает изменение электрофоретической подвижности (ЭФП) катионных СК⁺ по мере заполнения их поверхности анионными липосомами, то есть при нейтрализации поверхностного заряда щёток адсорбированными липосомами. На **рис. 11** представлены зависимости ЭФП комплексов для липосом с различной мольной долей анионных ФС¹⁻ «головок». Видно, что во всех случаях образование комплекса сопровождается уменьшением поверхностного заряда СК⁺ и переходом его в отрицательную область при больших концентрациях липосом. Увеличение доли анионного липида в липосомальной мембране требует меньшего количества (концентрации) липосом для нейтрализации заряда СК⁺ и одновременно повышает максимальный отрицательный заряд, приобретаемый СК⁺ в избытке липосом.

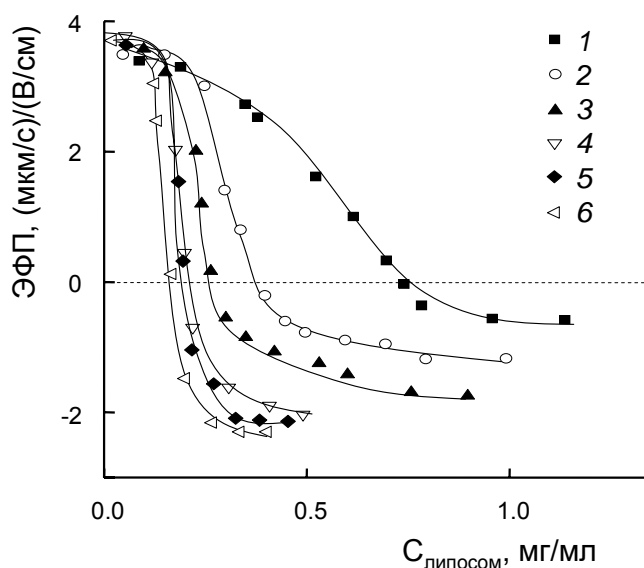


Рисунок 11.
Зависимость ЭФП частиц комплекса СК⁺/липосомы ФС¹⁻/ФХ от концентрации липосом. $\nu = 0.1$ (1), 0.2 (2), 0.3 (3), 0.4 (4), 0.5 (5), 0.54 (6). [СК⁺] = 1×10^{-4} осново-моль/л; 10^{-2} М трис буфер, рН 7.0, 20 °С.

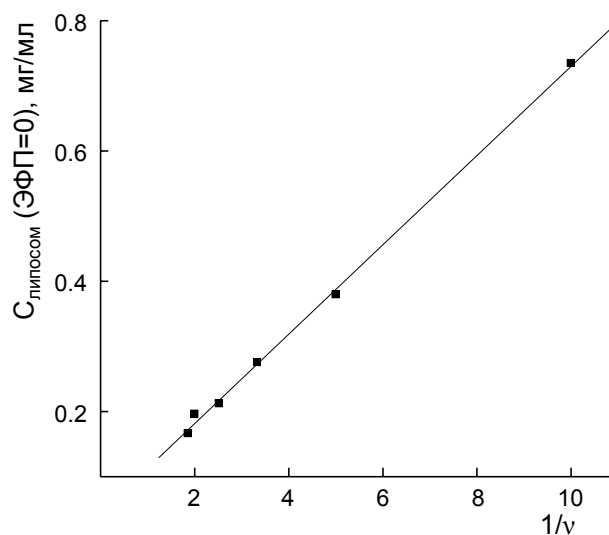


Рисунок 12.
Зависимость концентрации ФС¹⁻/ФХ липосом, включенных в электронейтральный (ЭФП=0) комплекс с СК⁺, от $1/\nu$. [СК⁺] = 1×10^{-4} осново-моль/л, 10^{-2} М трис буфер, рН 7.0, 20 °С.

Кривая 1 на **рис. 11** описывает электрофоретическое титрование суспензии СК⁺ суспензией 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. 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 (флип-флопом). Если индуцированный СК⁺ флип-флоп ФС¹⁻ молекул развивается в липосомах с различным содержанием ФС¹⁻, концентрация липосом в точке ЭФП = 0 ($[Лип]_{ЭФП=0}$) должна быть обратно пропорциональна ν . Действительно, значения $[Лип]_{ЭФП=0}$, полученные из **рис. 11**, описываются линейной зависимостью во всем интервале $1/\nu$ (**рис. 12**). Таким образом, СК⁺ индуцируют флип-флоп в адсорбированных липосомах всех исследованных составов.

При мольной доле ФС¹⁻ в мембране $\nu = 0.5$ и менее индуцированный СК⁺ флип-флоп не оказывает влияния на целостность липосом, поскольку миграция ФС¹⁻ с внутренней стороны мембраны на внешнюю компенсируется переходом равного количества нейтральных ФХ молекул в противоположном направлении: с внешней стороны мембраны на внутреннюю.

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. 8**). 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 доле $\text{КЛ}^{2-} \nu > 0.3$. Мембрана, содержащая смесь цилиндрического ФС^{1-} и цилиндрического ФХ , сохраняет целостность вплоть до содержания ФС^{1-} равного 0.5.

Второй из упомянутых выше методов, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), позволяет анализировать фазовые переходы в липидном бислое, что, в свою очередь, дает возможность следить за микрофазовым разделением в мембране адсорбированных липосом, т.е. распределением ФС^{1-} молекул в мембране $\text{ФС}^{1-}/\text{ФХ}$ липосом до и после их адсорбции на поверхности поликатионных щёток. Липидный бислой характеризуется температурой фазового перехода (температурой плавления) $T_{\text{ф}}$. Ниже температуры $T_{\text{ф}}$ липидный бислой находится в состоянии геля с резко ограниченной подвижностью липидных молекул (“твёрдые” липосомы). При температуре выше $T_{\text{ф}}$ 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. 13а** (кривая 1) и воспроизведена на **рис. 13б** (кривая 1) и **рис. 13в** (кривая 1).

Калориметрическая кривая смешанных $\text{ФС}^{1-}/\text{ДПФХ}$ липосом с $\nu = 0.1$ (**рис. 13а**, кривая 2) характеризуется широким фазовым переходом с пиком при 39 °С и плечом при 35 °С, которые отвечают плавлению двух смешанных $\text{ФС}^{1-}/\text{ДПФХ}$ микрофаз с различным соотношением компонентов. В дополнение к этому на кривой имеется еще один пик при 41 °С, который указывает на присутствие в мембране доменов, состоящих только из молекул электронейтрального ДПФХ.

Добавление СК^+ к суспензии липосом с $\nu = 0.1$ делает пик фазового перехода более узким с максимумом при 41 °С (**рис. 13а**, кривая 3), который отражает образование ДПФХ доменов, освобождённых от анионного ФС^{1-} в результате связывания последнего в электростатический комплекс с СК^+ . Плечо при 40 °С отвечает доменам ДПФХ с

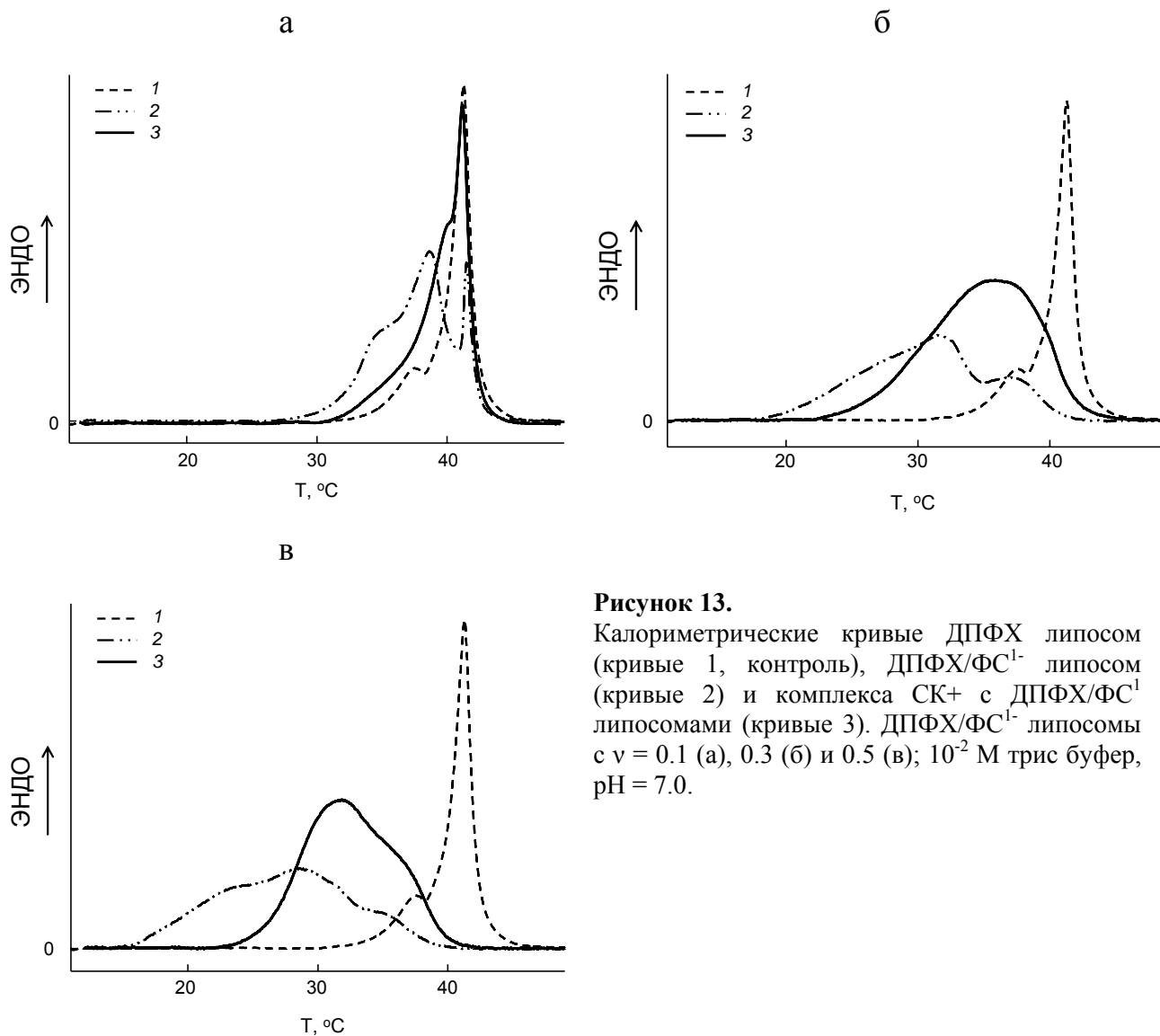


Рисунок 13.

Калориметрические кривые ДПФХ липосом (кривые 1, контроль), ДПФХ/ FC^{-1} липосом (кривые 2) и комплекса СК+ с ДПФХ/ FC^{-1} липосомами (кривые 3). ДПФХ/ FC^{-1} липосомы с $\nu = 0.1$ (а), 0.3 (б) и 0.5 (в); 10^{-2} М трис буфер, рН = 7.0.

незначительной примесью FC^{-1} . Что касается комплекса СК+/липосома, его фазовый переход лежит в области температур ниже 5°C , за пределами возможностей использованного микрокалориметра.

Повышение доли FC^{-1} в липосомальной мембране до $\nu = 0.3$ сопровождается заметным уширением калориметрической кривой и смещением её в область низких температур, при этом на кривой выделяются два максимума при 32°C и 38°C (рис. 13б, кривая 2). Добавление СК+ к липосомальной суспензии не влияет на диапазон температур фазового перехода, однако на кривой обнаруживается лишь один пик с максимумом при 37°C (рис. 13в, кривая 3). Отсутствие пика при 41°C указывает на то, что мембрана $\text{FC}^{-1}/\text{ФХ}$ липосом с $\nu = 0.3$, адсорбированных на поверхности СК+, не содержит доменов, состоящих из чистого ДПФХ: нейтральный ДПФХ включён в смешанные домены с анионным FC^{-1} .

В следующем эксперименте доля FC^{-1} в липосомальной мембране была увеличена до

$\nu = 0.5$, что соответствует предельному содержанию FC^{-1} , при котором липосомы все ещё сохраняют свою целостность после адсорбции. Широкий фазовый переход в таких липосомах (рис. 13в, кривая 2) указывает на образование доменов с различным соотношением обоих липидов. Последующее добавление СК^{+} к суспензии липосом не приводит к появлению $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ пика на калориметрической кривой и, следовательно, не вызывает разделения мембраны на две микрофазы: чистого ДПФХ и FC^{-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 формирует смешанные домены с анионным липидом.

Строение мембраны адсорбированных липосом представлено на рис. 14. При невысоком содержании FC^{-1} большая часть FC^{-1} молекул сосредоточена в области, непосредственно примыкающей к поверхности СК^{+} . Лишь немногие молекулы FC^{-1} остаются на противоположной (внешней) стороне адсорбированных липосом, обращенной в буферный раствор (рис. 14а); именно эти немногочисленные молекулы FC^{-1} придают комплексу невысокий отрицательный заряд, регистрируемый методом микроэлектрофореза (рис. 11, кривая 1). Увеличение доли анионного липида до $\nu = 0.3$ и далее до $\nu = 0.5$ приводит к последовательному увеличению количества молекул FC^{-1} на внешней стороне адсорбированных липосом (рис. 14б) и, как следствие, к прогрессивному возрастанию отрицательного заряда комплекса (рис. 11, кривые 2-5)

Таким образом, полное фазовое разделение в мембране липосом, адсорбированных на СК^{+} возможно лишь при малой доле анионного липида.

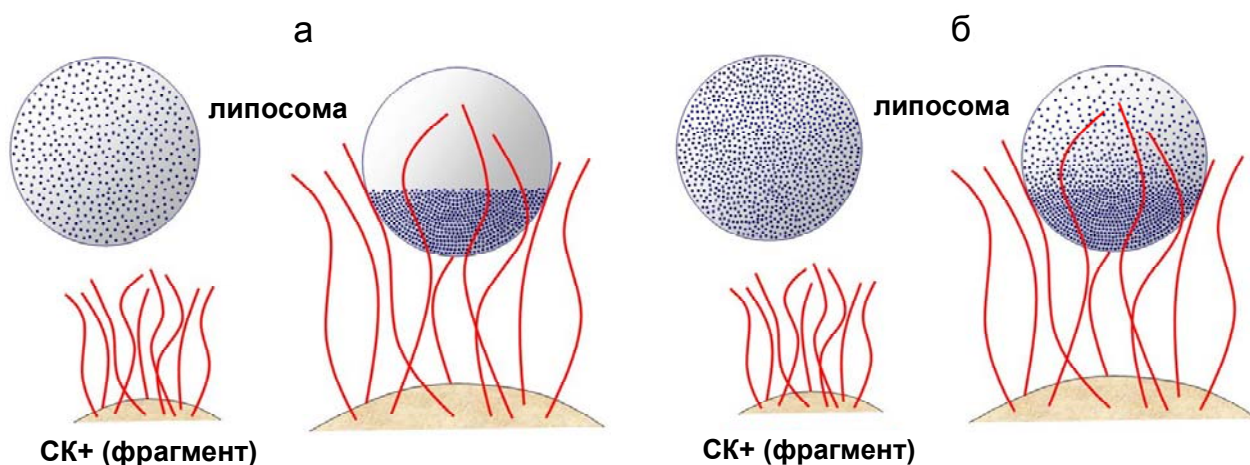


Рисунок 14.

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 $\nu = 0.3$.

3. Комплексы, содержащие липосомы с наполнителями различной химической природы

Сказанное выше относится к комплексам, полученным путем адсорбции на поверхности щёток липосом, запоненных 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 щётками. 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 ($\nu = 0.1$) липосом. Первые были заполнены водным раствором 7-гидроксифеноксазона (лакмуса) ($J_{\text{Лак}}$); в мембрану вторых был встроен гидрофобный краситель 1,1-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндо-карбоцианин перхлорат (ДИЛ) ($J_{\text{ДИЛ}}$); третьи содержали дипальмитоил-фосфатидилэтаноламин, ковалентно меченый карбоксифлуоресцеином (ДПФЭ-КФ) ($J_{\text{КФ}}$). Как видно из **рис. 15**, липосомы содержали разные типы наполнителей: гидрофильный, гидрофобный и гидрофильный с гидрофобным якорем.

Суспензии трёх типов липосом смешивали в разных весовых соотношениях $Q_{\text{исх}} = (J_{\text{Лак}})_{\text{исх}} / (J_{\text{ДИЛ}})_{\text{исх}} / (J_{\text{КФ}})_{\text{исх}}$, и полученные смеси добавляли к суспензии СК+ с таким расчетом, чтобы суммарная концентрация липосом вдвое превышала ту, которая обеспечивала насыщение поверхности щёток. После отделения комплекса центрифугированием в супернатанте спектрофотометрически определяли концентрацию каждого вида липосом. Липосомы, заполненные раствором лакмуса, детектировали при 586 нм, липосомы со встроенным ДИЛ при 551 нм и липосомы с ДПФЭ-КФ при 498 нм. Полученные результаты пересчитывали в концентрации связавшихся со щётками липосом и представляли в виде весового соотношения $Q_{\text{комп}} = (J_{\text{Лак}})_{\text{комп}} / (J_{\text{ДИЛ}})_{\text{комп}} / (J_{\text{КФ}})_{\text{комп}}$. Как видно из данных **Таблицы 1**, $Q_{\text{исх}} \approx Q_{\text{комп}}$ для всех исследованных смесей. Описанная методика является хорошей иллюстрацией предлагаемого нами простого способа получения мультилипосомальных контейнеров с контролируемым содержанием инкапсулированных веществ.

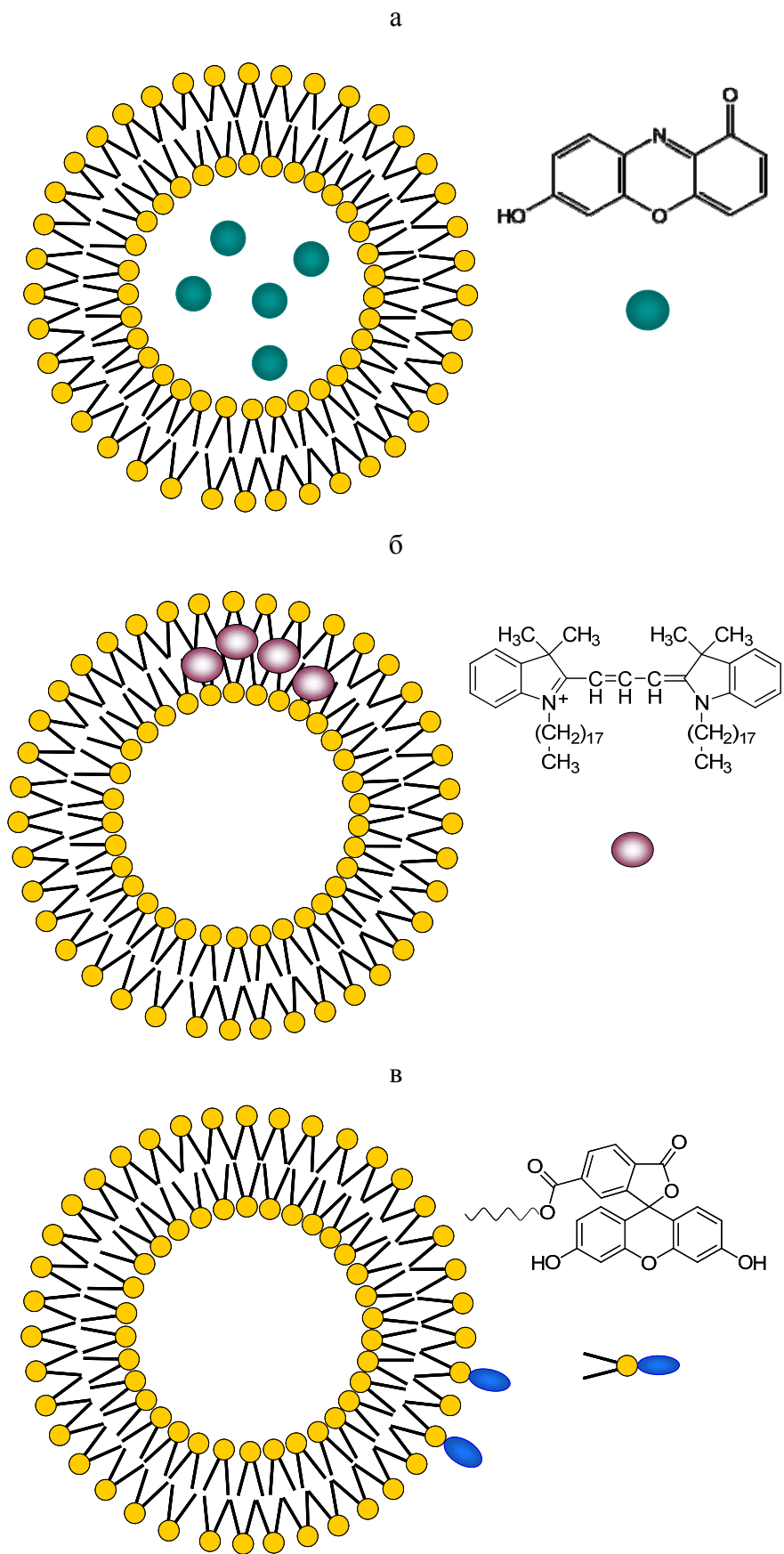


Рисунок 15. Схематическое изображение липосом с различными наполнителями: лакмус (а), ДИЛ (б) и ДПФЭ-КФ (в).

Таблица 1. Составы смесей липосом до и после связывания со СК+.

№ п/п	$Q_{исх} =$	$Q_{комп} =$
	$(L_{Лак})_{исх}/(L_{Дил})_{исх}/(L_{КФ})_{исх}$	$(L_{Лак})_{комп}/(L_{Дил})_{комп}/(L_{КФ})_{комп}$
1	0.66/1/1	0.6/1.15/1
2	0/1/2	0/1/1.85
3	0.1/1.5/1	0.16/1.4/1

4. Комплексы поликатионных щёток 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 воспалённых 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. 16**). Повышение кислотности среды и протонирование атома азота в молекуле ДОП 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. Использованные 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 $ФС^{1-}/ФХ$ липосом ($v = 0.1$).

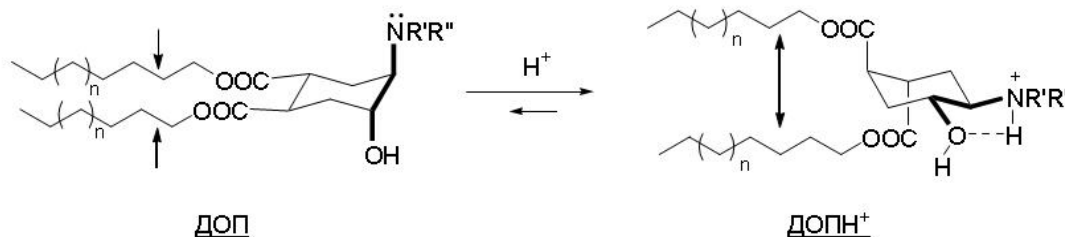


Рисунок 16. Схема конформационного перехода в ДОП-липиде при изменении рН среды.

На **рис. 17** (кривая 2) приведена зависимость ЭФП катионных щёток от концентрации добавленных тройных рН-чувствительных липосом в буферном растворе с рН 7. Эта кривая полностью повторяет профиль ЭФП зависимости катионных щёток в присутствии бинарных $ФС^{1-}/ФХ$ липосом с $v = 0.1$, не содержащих ДОП-липиды (**рис. 17**, кривая 1). Такой вид

кривой электрофоретического титрования для рН-чувствительных липосом отражает их адсорбцию на поверхности катионных щёток при рН 7 и указывает на то, что движущей силой адсорбции является образование солевых связей между анионными группами FC^{1-} и катионными группами СК^+ . Третичные аминогруппы ДОП-липида при рН 7 находятся в непротонированной (незаряженной) форме и поэтому не вносят вклад в электростатическую адсорбцию $\text{FC}^{1-}/\text{ФХ}/\text{ДОП}$ липосом.

Иная картина наблюдается в растворе с рН 5: ЭФП щёток в присутствии рН-чувствительных липосом описывается горизонтальной кривой 5 (рис. 17), в то время как соответствующая кривая 4 для бинарных липосом по-прежнему имеет δ -образный вид 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 щёток в этих условиях.

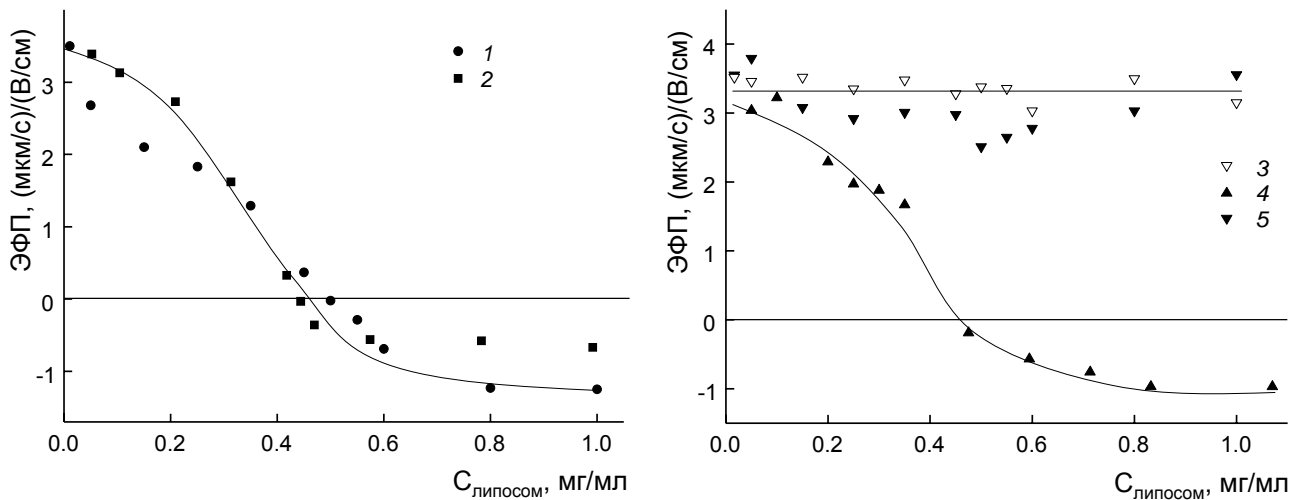


Рисунок 17.

Зависимость ЭФП поликатионных щёток от концентрации липосом. Комплексы $\text{СК}^+/\text{липосомы}$ $\text{FC}^{1-}/\text{ФХ}$ при рН 7 (1) и рН 5 (4); комплексы $\text{СК}^+/\text{липосомы}$ $\text{FC}^{1-}/\text{ФХ}/\text{ДОП}$ при рН 7 (2) и рН 5 (5); $\text{FC}^{1-}/\text{ФХ}/\text{ДОП}$ липосомы были адсорбированы на поверхности щёток при рН 7, после чего раствор был подкислен до рН 5 (3). $[\text{СК}^+] = 1 \times 10^{-4}$ осново-моль/л.

Причина такого расхождения в поведении липосом с ДОП-липидом и без него заключается в следующем. Понижение рН раствора сопровождается протонированием аминогрупп ДОП-липида, нейтрализацией отрицательного заряда FC^{1-} молекул и уменьшением суммарного заряда рН-чувствительных липосом. При рН 5 суммарный заряд рН-чувствительных липосом переходит в положительную область и становится равным 0.78 (мкм/с)/В/см). Такие липосомы перестают связываться с положительно заряженными поликатионными щётками. Что касается бинарных липосом, их отрицательный заряд в основном определяется фосфатными группами FC^{1-} молекул, степень диссоциации которых

близка к максимальной при обоих значениях pH. Именно это и определяет одинаковую эффективность связывания бинарных липосом с СК+ при pH 7 и 5.

Поведение комплекса поликатионных щёток и pH-чувствительных липосом, сформированного при pH 7 и затем перемещенного в закисленный внешний раствор с pH 5, представляет особый интерес. Этот эксперимент моделирует ситуацию, когда мультилипосомальный контейнер, введённый в кровоток с pH близким к нейтральному, попадает в слабокислую среду характерную для воспалённых тканей и опухолей.

Зависимость ЭФП комплекса, полученного в растворе с pH 7 и затем доведенного до pH 5, представлена кривой 3 на **рис. 17**. 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 pH 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. 18**).

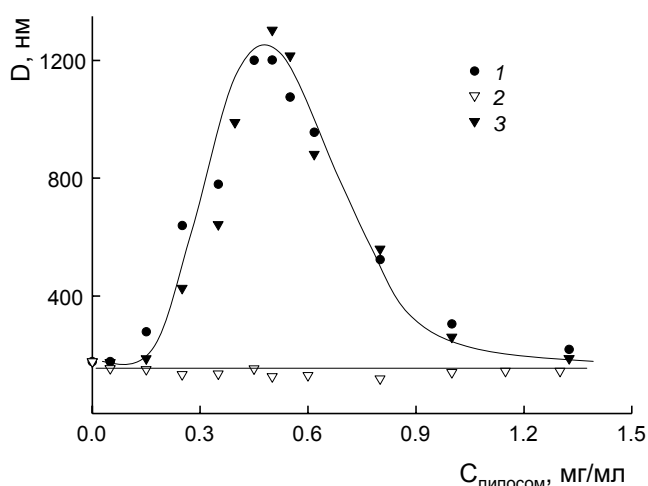


Рисунок 18.

Зависимость гидродинамического диаметра поликатионных щёток от концентрации липосом. ФС¹⁻/ФХ/ДОП липосомы: pH 7 (1) и 5 (2); ФС¹⁻/ФХ/ДОП липосомы были адсорбированы на поверхности СК+ при pH 7, после чего раствор был подкислен до pH 5 (3). [СК+] = 1×10^{-4} осново-моль/л.

Добавление pH-чувствительных липосом к суспензии СК+ при pH 7 приводит к укрупнению частиц в системе (**рис. 18** кривая 1), агрегаты наибольшего размера образуются при полной нейтрализации заряда щёток зарядом адсорбированных липосом (ср. с кривой 2 на **рис. 17**). Смешение тех же компонентов при pH 5 не сказывается на размере частиц (**рис. 18**, кривая 2), что коррелирует с отсутствием комплексообразования в этих условиях по данным электрофореза (**рис. 17**, кривая 5). В «закисленной» системе мы наблюдаем формирование агрегатов (**рис. 18**, кривая 3), что очевидно указывает на сохранение связывания липосом с поверхностью щёток после смены pH раствора с 7 на 5. Выше мы говорили о том, что связывание $\nu = 0.1$ анионных липосом с поликатионными

щётками сопровождается латеральной сегрегацией липидов, в результате которой бóльшая часть анионных липидных молекул концентрируется в области, непосредственно примыкающей к поверхности щёток (**рис. 146**), при этом цвиттер-ионные молекулы ФХ и непротонированные молекулы ДОП-липида вытесняются на противоположную (обращённую во внешний раствор) сторону липосомы. Электростатическое взаимодействие анионного домена в липосомальной мембране и катионной поверхности щёток оказывается настолько прочным, что сохраняется и после протонирования ДОП-липидов и появления положительного заряда на внешней поверхности комплекса.

Методом спектрофотометрии (см. детали на стр. 5-6) было показано, что каждая катионная щётка способна в среднем связать около 40 рН-чувствительных липосом.

Способность $\text{FC}^{1-}/\text{ФХ}/\text{ДОП}$ липосом высвобождать инкапсулированное вещество при закислении раствора была исследована методом кондуктометрии. В контрольном эксперименте, когда заполненные солевым раствором липосомы добавляли к суспензии поликатионных щёток в буфере с рН 7, уровень электропроводности не менялся в течение 2 часов после смешения компонентов. Иными словами, целостность липосом сохраняется после их связывания с СК+. Закисление внешнего раствора до рН 5 приводит 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 щёток в растворе с рН 5 наблюдается гораздо более медленное вытекание соли: 12.5% за первые 10 минут после смены внешнего раствора с рН 7 до рН 5. Полученные результаты показывают, что липосомы со встроенным ДОП-липидом высвобождают инкапсулированное вещество в ответ на изменение рН раствора и скорость выхода вещества из мультилипосомальных комплексов существенно превышает скорость выхода вещества из несвязанных в комплекс липосом.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что липосомы, сформированные из смеси нейтрального и анионного липидов, электростатически адсорбируются на поверхности полистирольных микросфер с привитыми поликатионными цепями («сферических поликатионных щёток»). Целостность адсорбированных липосом определяется мольной долей анионного липида (ν) и геометрией его молекул: для кардиолипина, молекулы которого имеют форму усечённого 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 показано, 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 $v = 0.1$).

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

5. Впервые получены комплексы, содержащие поликатионные щётки 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.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1) Статьи из перечня ВАК РФ российских рецензируемых научных журналов

1. Заборова, О.В. Строение и свойства комплексов поликатионных щеток с анионными липосомами / О.В. Заборова, А.В. Сыбачин, М. Ballauff, А.А. Ярославов // Высокомолек. соед. Сер. А. — 2011. — Т. 53, № 11. — С. 1877–1884.

2) Статьи из журналов, индексируемых Web of Science

2. Sybachin, A.V. Complexes between anionic liposomes and spherical polycationic brushes. An assembly of assemblies / A.V. Sybachin, O.V. Zaborova, V.N. Orlov, P.I. Semenyuk, M. Ballauff, E. Kesselman, J. Schmidt, Y. Talmon, F.M. Menger, A.A. Yaroslavov // Langmuir — 2014. — Vol. 30, no. 9. — P. 2441-2447.
3. Yaroslavov, A.A. Lipid segregation in membranes of anionic liposomes adsorbed onto polycationic brushes / A.A. Yaroslavov, A.V. Sybachin, O.V. Zaborova, V.N. Orlov, M. Ballauff, Y. Talmon, F.M. Menger // Chemistry - A European Journal. — 2013. — Vol. 19, no. 41. — P. 13674–13678.
4. Sybachin, A.V. Composition and properties of complexes between spherical polycationic brushes

and anionic liposome / A.V. Sybachin, O.V. Zaborova, M.M. Ballauff, E. Kesselman, J. Schmidt, Y. Talmon, F.M. Menger, A.A. Yaroslavov // *Langmuir* — 2012. — Vol. 28, no. 46. — P. 16108–16114.

3) Материалы конференций

5. Калашникова И.В., Заборова О.В. Структура и свойства комплексов полипептидных везикул с анионными липосомами // Материалы Международного молодёжного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2013» [Электронный ресурс]. – М.: МАКС Пресс, 2013. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM), 63.
6. Zaborova O.V., Sybachin A.V. Influence of anionic lipid fraction on lipid rearrangements in the membrane of anionic liposomes induced by complexation with polycationic particles // IV International conference on colloid chemistry and physicochemical mechanics, 2013, Moscow, Russia. Book of abstracts, PP23.
7. Zaborova O.V., Sybachin A.V., Orlov V.N., Yaroslavov A.A. Structural rearrangements in membranes of anionic liposomes induced by their adsorption on the spherical polycationic brushes // Austrian-Slovenian polymer meeting, 2013, Bled, Slovenia. Book of abstracts, S2-P20.
8. Sybachin A.V., Zaborova O.V., Talmon Y., Ballauff M., Yaroslavov A.A., Non-destructive adsorption of anionic liposomes // 12th Biannual Bayreuth Polymer Symposium "BPS 11", 2011, Bayreuth, Germany. Book of abstracts, P. 30.
9. Zaborova O.V., Sybachin A.V., Ballauff M., Yaroslavov A.A., Spherical polycationic brushes decorated by anionic liposomes // 12th Biannual Bayreuth Polymer Symposium "BPS 11", 2011, Bayreuth, Germany. Book of abstracts, P. 28.
10. Заборова О.В. Новые наноконтейнеры на основе комплексов отрицательно заряженных липосом с поликатионными щётками // Материалы Международного молодёжного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2011» [Электронный ресурс]. – М.: МАКС Пресс, 2011. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM), 32.

Список сокращений

ДИЛ – 1,1-диооктадециол-3,3,3',3'-тетраметилиндо-карбоцианин перхлорат
ДОП – транс-3,4-дигидроксипиперидин
ДОФХ – диолеилфосфатидилхолин
ДОФЭ-СР – 1,2-диолеил-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(лиссамин сульфородамин Б)
ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин
ДПФЭ-ФИТЦ – дипальмитоил-фосфатидилэтанолламин, меченный флуоресцеинизотиоцианатом
ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия
КЛ²⁻ – кардиолипин
Крио-ТЕМ – криогенная трансмиссионная микроскопия
Лак – лакмус
СК⁺ – сферические полкатионные щётки
ФС¹⁻ – фосфатидилсерин
ФХ – фосфатидилхолин
ЭФП – электрофоретическая подвижность