

УДК: 541(49+64):547.963.32

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНИОННЫХ ЛИПОСОМ С КАТИОННЫМ ПИРИДИЛФЕНИЛЕНОВЫМ ДЕНДРИМЕРОМ

К.С. Трошева^{1*}, С.А. Сорокина², А.А. Ефимова¹

(¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; ²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН; *e-mail: trosheva_ksyu@mail.ru)

Получены комплексы катионного пиридилфениленового дендримера с твердыми и жидкими анионными липосомами. Адсорбция дендримера на поверхности липосом сопровождается нейтрализацией их поверхностного заряда, а также увеличением размера частиц. При взаимодействии с жидкими липосомами дендример не индуцирует перехода молекул отрицательно заряженного липида из внутреннего монослоя во внешний (флип-флоп). В комплексе на одну липосому приходится около 80 молекул дендримера.

Ключевые слова: липосома, поликатион, дендример, связывание.

Исследования адсорбции синтетических водорастворимых полимеров на биологических мембранах ведутся на протяжении нескольких десятилетий [1–4]. Для изучения физико-химических аспектов взаимодействия полимеров с биомембранами используют модельные системы, среди которых широкое распространение получили сферические бислойные липидные везикулы – липосомы [5, 6].

В настоящее время описаны состав и строение комплексов липосом с полимерами, их устойчивость в водно-солевых средах, исследованы структурные перестройки в липосомальных мембранах, вызванные адсорбцией полимера, показано, как полимеры влияют на проницаемость мембран [7, 8]. В большинстве работ такого рода рассматривают взаимодействие линейных полимеров с липосомами [9].

В нашей работе изучено взаимодействие с липосомами полимера разветвленного строения – катионного дендримера. Дендримеры – трехмерные разветвленные макромолекулы регулярного строения, обладающие несомненными достоинствами, такими как монодисперсность и возможность надежного контроля над размером, формой и функциональностью. В последнее время дендримеры находят широкое применение в медицине в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии, в диагностике *in vitro* [10, 11]. Ввиду этого важно изучить их взаимодействие с липосомами, моделирующими биологические мембраны.

В данной работе описано взаимодействие анионных твердых и жидких липосом с катионным

пиридилфениленовым дендримером 3-й генерации. Жидкое и твердое состояния мембран различаются набором параметров, среди которых наиболее важна подвижность липидов. В твердом состоянии подвижность липидных молекул как целого резко ограничена. В жидком состоянии липидные молекулы приобретают способность перемещаться вдоль каждого из формирующих мембрану монослоев (латеральная подвижность) и переходить из одного монослоя в другой (трансмембранная миграция или флип-флоп). Особое внимание уделено составу полученных комплексов.

Экспериментальная часть

Объекты. Катионный пиридилфениленовый дендример третьей генерации D_3^{66+} представляет собой индивидуальную макромолекулу с молекулярной массой 14440, рассчитанной исходя из степени алкилирования дендримера (81%) (рис. 1). Дендример синтезирован дивергентным методом с использованием реакции Дильса–Альдера между этинильными производными и тетраарилзамещенными пиридилсодержащими циклопентадиенами в соответствии с методикой, опубликованной ранее [12]. Пиридилные группы алкилированы по реакции Меншуткина, степень алкилирования 81% (¹H ЯМР). Направленная модификация дендримеров позволила изменить гидрофобную природу ароматических дендримеров на гидрофильную в целях получения водорастворимых соединений. Высокая плотность положительного заряда обеспечивает взаимодействие таких дендримеров с отрица-

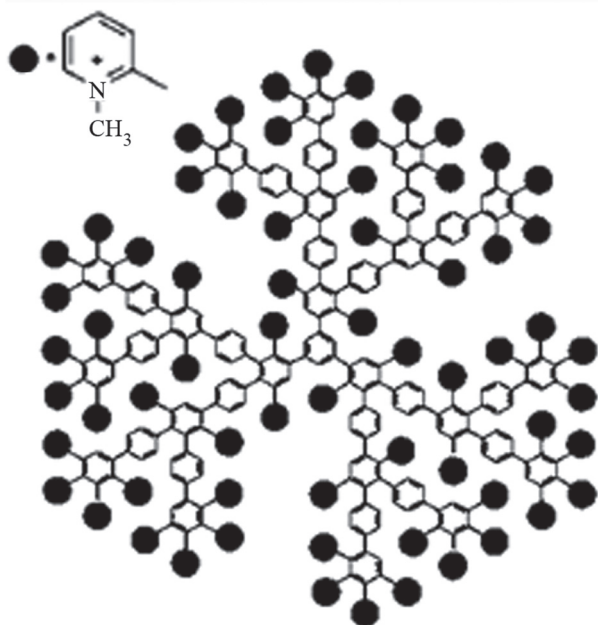


Рис. 1. Схематичное изображение структурной формулы катионного пиридилфениленового дендримера

тельно заряженными частицами [12] (в частности, анионными липосомами).

Фосфатидилхолин – яичный лецитин (ФХ), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), дифосфатидилглицерол – кардиолипин (КЛ²⁻) («Avanti») использовали без дополнительной

очистки. Структурные формулы веществ представлены на рис. 2.

В работе использованы малые моноламеллярные липосомы, размер которых лежит в интервале от 30 до 50 нм. Малые моноламеллярные липосомы получали методом озвучивания [13]. Для этого смешивали необходимое количество растворов КЛ и ФХ в смеси метанол – хлороформ и удаляли органический растворитель на вакуумном роторном испарителе при 30 °С. Образовавшуюся липидную пленку диспергировали в 2 мл 10⁻³ М фосфатного буфера (рН 7,1). Затем на суспензию воздействовали ультразвуком частотой 22 кГц в течение 600 с (2×300 с) в непрерывном режиме при постоянном охлаждении водой. Использовали ультразвуковой диспергатор 4710 («Cole-Parmer»). Полученные липосомы отделяли от титановой пыли на центрифуге «J-11» («Beckman») в течение 5 мин при скорости 12 тыс. об/мин. Мольную долю отрицательно заряженных «головок» определяли по формуле (молекулы КЛ²⁻ несут две анионные группы):

$$v_{\text{КЛ}} = 2[\text{КЛ}^{2-}] / (2[\text{КЛ}^{2-}] + [\text{ФХ}]) = 0,1.$$

Твердые липосомы состава КЛ/ДПФХ получали по аналогичной методике, но упаривание растворителя и обработку водной дисперсии липидов проводили при 55 °С. Мольная доля отри-

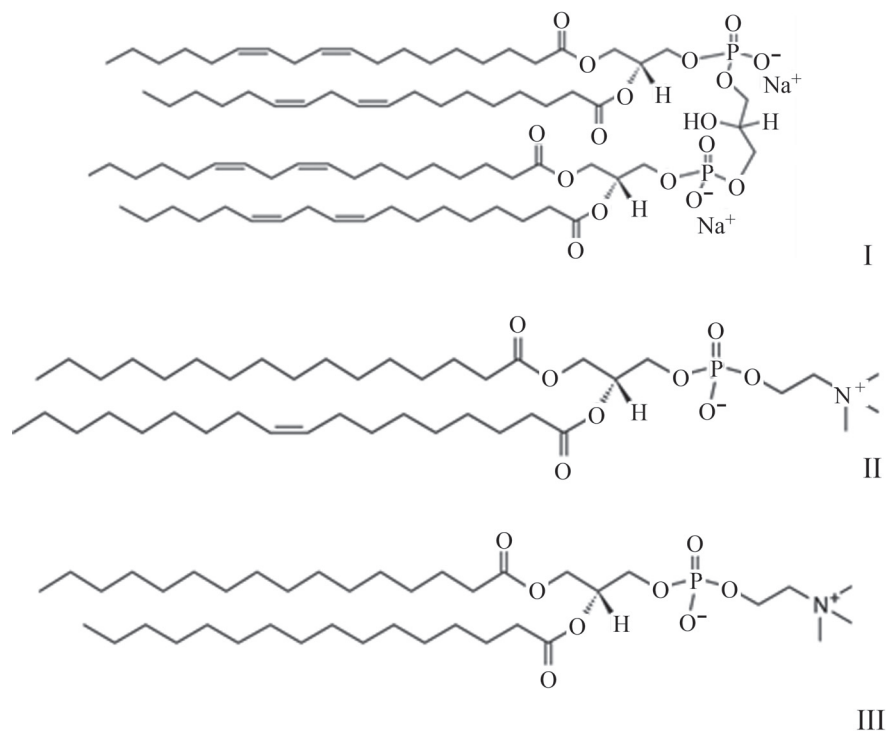


Рис. 2. Структурные формулы липидов: КЛ²⁻ (I), ФХ (II), ДПФХ (III)

цательно заряженных полярных «головок» ($v_{\text{кл}}$) составляла 0,1.

В работе использовали двухводный гидрофосфат натрия $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и двухводный дигидрофосфат натрия $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (марки «х.ч.») без дополнительной очистки. Буферный раствор концентрации 10^{-2} М готовили по навеске.

Воду очищали двойной перегонкой с последующим пропусканием через систему «Milli-Q» («Millipore»), включающую ионообменные адсорбционные колонки для глубокой очистки от органических примесей и фильтры для удаления крупных частиц. Удельная электропроводность очищенной воды составляла 0,6 мкСм/см.

Методы. Средний гидродинамический диаметр (размер) липосом оценивали методом динамического светорассеяния с помощью прибора «Brookhaven 90 Plus» («Brookhaven Instruments Company», США) при фиксированном угле (90°). Флуктуацию интенсивности света регистрировали с помощью коррелятора «Brookhaven 90 Plus» («Brookhaven Instruments Company», США). Величину гидродинамических радиусов рассчитывали с использованием уравнения Стокса в приближении сферических частиц.

Электрофоретическая подвижность липосом измерена с помощью лазерного микроэлектрофореза на приборе «Brookhaven 90 Plus» («Brookhaven Instruments Company», США) в термостатируемой ячейке по стандартной методике, предложенной производителем.

С помощью рН-метра «210 Hanna» оценивали рН растворов. В качестве измерительного электрода использовали стеклянный электрод «НН 1131В».

Осаждение комплексов анионных липосом и дендримера проводили на центрифуге «J2-21» («Beckman») в течение 40 мин со скоростью вращения ротора 18 тыс. об/мин. Аналитическое определение концентраций дендримера в растворе проводили методом УФ-спектроскопии на спектрофотометре «UV-Mini» («Shimadzu») по характеристической полосе поглощения кватернизованного пиридиниевого кольца. Для этого измеряли оптическую плотность растворов при длине волны $\lambda = 257$ нм в кюветках с толщиной поглощающего слоя 1,0 см.

Результаты и обсуждение

За взаимодействием катионного дендримера и анионных липосом следили по изменению электрофоретической подвижности (ЭФП) частиц в системе методом микроэлектрофореза.

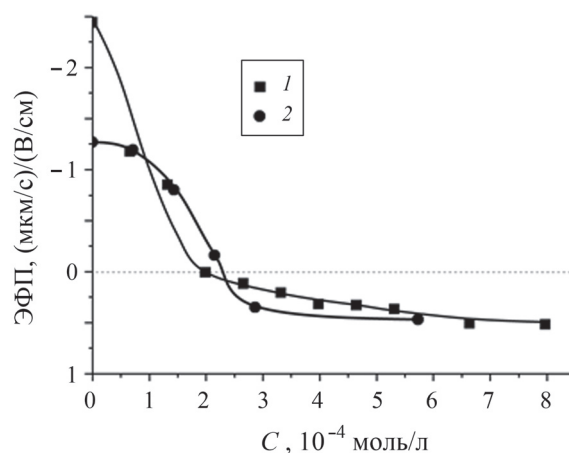


Рис. 3. Зависимость электрофоретической подвижности частиц комплекса дендример–липосомы от концентрации дендримера. Липосомы: 1 – жидкие КЛ/ФХ, 2 – твердые КЛ/ДПФХ ($v_{\text{кл}} = 0,1$; $C_{\text{Lip}} = 1$ мг/мл; фосфатный буфер 10^{-3} М, рН 7,1)

Было установлено, что добавление дендримера к жидким и твердым липосомам сопровождается нейтрализацией поверхностного заряда частиц (рис. 3).

Известно, что некоторые линейные поликатионы (например, поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид, содержащий аналогичные исследуемому дендримеру пиридиниевые группы) при адсорбции на жидких липосомах способны индуцировать переход молекул отрицательно заряженного КЛ из внутреннего монослоя во внешний (флип-флоп). В твердых липосомах такого индуцированного флип-флопа не происходит, так как липиды не обладают необходимой подвижностью. Это выражается в том, что в твердых липосомах с исходным равномерным распределением анионного липида между монослоями в образовании электростатического комплекса с катионным полимером участвуют только анионные липиды, расположенные на внешней стороне липосомальной мембраны (половина от общего количества анионных липидов в мембране). При связывании поликатиона с жидкими липосомами в образовании солевых связей принимают участие все анионные липиды [9]. Поэтому для нейтрализации заряда жидких липосом требуется вдвое большее количество полимера, чем для твердых (при одинаковом содержании анионного липида). Мы установили, что при взаимодействии дендримера с липосомами значения его концентрации в точке нулевого заряда для жидких и твердых липосом совпадают (рис. 3). Полученный результат означает, что дендример при взаимодействии с

жидкими липосомами не индуцирует переход молекул КЛ из внутреннего слоя во внешний, а в образовании комплекса как с жидкими, так и с твердыми липосомами принимает участие лишь половина всего количества КЛ, расположенного на внешней стороне липидной мембраны.

Ранее было показано, что возможностью линейного полимера образовывать петли на поверхности липосом обусловлена его способность вызывать флип-флоп, так как нескомпенсированный заряд на петле выступает движущей силой трансмембранной миграции липидов [14]. Очевидно, что «жесткие» сферические частицы дендримера адсорбируются на поверхности ли-

посом без образования петель, чем и объясняется отсутствие флип-флопа.

Параллельные измерения размеров частиц комплекса показали, что по мере нейтрализации заряда липосом, сопровождающей адсорбцию дендримера, наблюдается увеличение размера частиц в системе (рис. 4).

Чтобы оценить, весь ли добавленный поликаатион связывается с липосомами, образовавшиеся комплексы дендримера с липосомами были отделены от раствора центрифугированием, а затем надосадочная жидкость была проанализирована на содержание дендримера методом УФ-спектроскопии. Анализ зависимости концентрации дендримера в надосадочной жидкости от его общей концентрации в системе позволяет заключить, что дендример полностью связывается с жидкими и твердыми липосомами вплоть до концентрации $\sim 2,5 \times 10^4$ моль/л (что соответствует 0,07 г/л), которая незначительно превышает необходимую для полной нейтрализации (рис. 5).

Полученные данные позволили оценить количество молекул дендримера (N), способных к комплексообразованию с одной липосомой. Для этого было использовано следующее отношение:

$$= \frac{(C \cdot N_A) M_d}{C_{\text{Lip}} \cdot S_1 \cdot N} / 2\pi d M$$

Рис. 4. Зависимость размера частиц комплекса дендример – липосомы от концентрации дендримера. Липосомы: 1 – жидкие КЛ/ФХ, 2 – твердые КЛ/ДПФХ ($v_{\text{кл}} = 0,1$; $C_{\text{Lip}} = 1$ мг/мл; фосфатный буфер 10^{-3} М, pH 7,1)

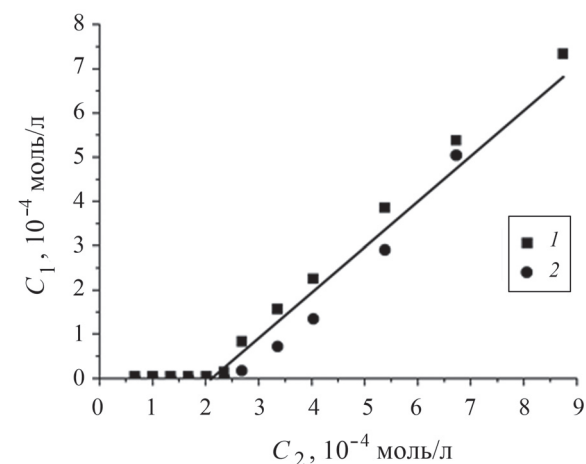


Рис. 5. Зависимость концентрации дендримера в надосадочной жидкости (C_1) от концентрации дендримера при формировании комплекса (C_2). Липосомы: 1 – жидкие КЛ/ФХ, 2 – твердые КЛ/ДПФХ ($v_{\text{кл}} = 0,1$; $C_{\text{Lip}} = 1$ мг/мл; фосфатный буфер 10^{-3} М, pH 7,1)

где N_D – количество молекул дендримера, N_{Lip} – количество липосом, C_{Lip} – концентрация липидов при насыщении (1 мг/мл), S_1 – средняя площадь поверхности на молекулу липида ($0,7 \text{ nm}^2$), d – диаметр липосом (50 нм), M – средняя молекулярная масса липида (750 г/моль), C_0 – концентрация дендримера при насыщении (г/л), M_d – молекулярная масса дендримера (14440 г/моль), N_A – число Авогадро.

При подстановке экспериментальных значений получаем $N = 80$, т.е. в среднем на одну жидкую или твердую липосому приходится около 80 молекул дендримера.

Выводы

Показано, что катионный пиридилфенильный дендример взаимодействует с твердыми и жидкими анионными липосомами, вызывая нейтрализацию поверхностного заряда липосом и рост размера частиц в системе. При взаимодействии с жидкими липосомами дендример не индуцирует переход молекул КЛ из внутреннего моно слоя во внешний (флип-флоп). Установлено, что в комплексе с жидкими и твердыми липосо-

мами на одну липосому приходится около 80 молекул дендримера.

Работа выполнена в рамках проекта: «Современные проблемы химии и физико-химии вы-

сокомолекулярных соединений» (госбюджет, номер АААА-А16-116031050014-6).

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Yaroslavov A., Sybachin A., Zaborova O., Orlov V., Ballauff M., Talmon Y. et al. // Chemistry A European Journal. 2013. Vol. 19. P. 13674.
2. Yaroslavov A.A., Sitnikova T.A., Rakhnyanskaya A.A., Ermakov Y.A., Burova T.V., Grinberg V.Y. et al. // Langmuir. 2007. Vol. 23. P. 7539.
3. Yaroslavov A., Kuchenkova O., Okuneva I., Melik-Nubarov N., Kozlova N., Lobyshev V. et al. // Biochim Biophys Acta. 2002. Vol. 1611. P. 44.
4. Cao Z., Zhang L., Jiang S. // Langmuir. 2008. Vol. 28. P. 11625.
5. Bozzuto G., Molinari A. // International journal of nanomedicine. 2015. Vol. 10. P. 975.
6. Burgess P., Hutt P.B., Farokhzad O.C., Langer R., Minick S., Zale S. // Nature biotechnology. 2010. Vol. 28. P. 1267.
7. Yaroslavov A., Kiseliova E., Udalykh O., Kabanov V. // Langmuir. 1998. Vol. 14. P. 5160.
8. Kepczynski M., Jamróz D., Wytrwal M., Bednar J., Rząd E., Nowakowska M. // Langmuir. 2011. Vol. 28. P. 676.
9. Efimova A.A., Sybachin A.V., Yaroslavov A.A. // Polymer Science Series C. 2011. Vol. 53. P. 89.
10. Esmaili E., Khalili M., Sohi A.N., Hosseinzadeh S., Taheri B., Soleimani M. // Journal of cellular physiology. 2019. Vol. 234. P. 12615.
11. McMahon M.T., Bulte J.W.M. // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2018. Vol. 10. P. 1496.
12. Shifrina Z.B., Kuchkina N.V., Rutkevich P.N., Vlasik T.N., Sushko A.D., Izumrudov V.A. // Macromolecules. 2009. Vol. 42. P. 9548.
13. Ivashkov O.V., Sybachin A.V., Efimova A.A., Pergushov D.V., Orlov V.N., Schmalz H., Yaroslavov A.A. // Polymer International. 2017. Vol. 66. P. 1669.
14. Ivashkov O.V., Sybachin A.V., Efimova A.A., Pergushov D.V., Orlov V.N., Schmalz H., Yaroslavov A.A. // Chem. Phys. Chem. 2015. Vol. 16. P. 2849.

Поступила в редакцию 10.09.2019

Получена после доработки 12.10.2019

Принята к публикации 14.11.2019

THE INTERACTION OF ANIONIC LIPOSOMES WITH CATIONIC PYRIDYLPHENYLENE DENDRIMERS

K.S. Trosheva^{1*}, S.A. Sorokina², A.A. Efimova¹

(¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry; ² A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences; *e-mail: trosheva_ksyu@mail.ru)

Complexes of cationic pyridylphenylene dendrimers with solid and liquid anionic liposomes were obtained. Adsorption of a dendrimer on the surface of liposomes is accompanied by neutralization of their surface charge and an increase in particle size. When interacting with liquid liposomes, the dendrimer does not induce the transition of molecules of a negatively charged lipid from the internal to the external monolayer (flip-flop). In the complex, there are about 80 dendrimer molecules per liposome.

Key words: liposome, polycation, dendrimer, binding.

Сведения об авторах: Трошева Ксения Сергеевна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (trosheva_ksyu@mail.ru); Ефимова Анна Александровна – доцент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (efimova@genebee.msu.su); Сорокина Светлана Анатольевна – мл. науч. сотр. Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (ИНЭОС РАН) (sorok.svetlana@gmail.com).