

УДК 541.(49+64):539.2

## pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ЛИПОСОМЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФОСФОЛИПИДОВ С ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ И ГРЕБНЕОБРАЗНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ

Максименко О. О., Фельдштейн М. М., Панарин Е. Ф.,  
Васильев А. Е., Торчилин В. П., Платэ Н. А.

Изучено влияние полимеров различной структуры (поликатиона, поланиона, гребнеобразного нейтрального полимера и гребнеобразного поликатиона) на проницаемость липосом из дипальмитоилфосфатидилхолина для включенных внутрь низкомолекулярных маркеров – 6-карбоксифлуоресцеина и [<sup>3</sup>H]-глюкозы в зависимости от pH среды. Наибольшее воздействие на проницаемость липосом оказывает гребнеобразный поликатион – сополимер N-виниллпирролидона и винилоктиламина, вызывая резкое увеличение скорости выхода маркеров из липосом при pH 7,0. В присутствии поликатиона – полидиметиламиноэтилметакрилата проницаемость липосом с введенным в бислой гребнеобразным полимером (полицетилметакрилатом) также увеличивается в узком интервале pH, достигая максимальных значений при pH 7,5.

В настоящее время липосомы широко изучаются как перспективные носители для направленного транспорта лекарственных веществ в организмы [1]. Одна из проблем, возникающая в связи с этим, – создание pH-чувствительных липосом, т. е. липосом, способных высвобождать содержимое в мишеньях с измененным pH в организме. До сих пор внимание исследователей было привлечено в основном к изучению влияния pH на слияние липосом с клеточными мембранами [2, 3]. Механизм этого явления пока недостаточно изучен, однако известно, что слияние происходит при понижении pH. Слияние может быть вызвано присутствием белков или других макромолекул, а также может проходить даже без их участия и зависеть только от состава липосом и pH [4, 5].

Известно, что в очагах воспаления, опухолеобразования pH понижено [6]. Аналогичные явления отмечаются в зонах некроза при инфаркте миокарда и при ряде других заболеваний. В связи с этим представляется целесообразным создание липосом, проницаемость которых для включенных в них веществ увеличивалась бы при небольшом изменении (например, уменьшении) pH в физиологической области. Один из путей достижения этой цели – введение в липидную мембрану липидов, меняющих свою структуру и соответственно проницаемость липидного бислоя при изменении pH [7].

В работах [8, 9] были предприняты попытки использовать полиэлектролиты для воздействия на структуру и свойства липидного бислоя, в частности на его проницаемость.

В работах [10, 11] показано, что дифильные ионы ПАВ и липидов способны вступать в кооперативные реакции с полиэлектролитами с образованием электростатических комплексов, напоминающих комплексы между противоположно заряженными полиэлектролитами. Эти реакции являются pH-чувствительными, т. е. образование или разрушение таких комплексов происходит в узком интервале pH раствора. Ранее было показано [12, 13], что взаимодействие синтетического поликатиона с липосомами приводит к изменению их проницаемости для включенных в них веществ, причем в зависимости от состава липосом полиэлектролит способен либо увеличивать, либо уменьшать их проницаемость.

Данная работа посвящена изучению возможности создания рН-чувствительных липосом на основе их комплексов с полиэлектролитами, а также гребнеобразными полимерами.

Синтетический дипальмитоилфосфатидхолин (ДПФХ), дипальмитоилфосфатидовую кислоту (ДПФК) («Koch-Light», США), стеариламин («Sigma», США) использовали без предварительной очистки. Полиметакриловая кислота (ПМАК) с  $\bar{M}_w = 1,2 \cdot 10^5$  была любезно предоставлена Кеменовой (НПО «Биотехнология»). Полицетилметакрилат (ПЦМА) с  $\bar{M}_w = 1 \cdot 10^4$  был синтезирован Фрейдзоном (МГУ им. М. В. Ломоносова) [14]. Полидиметиламиноэтилметакрилат (ПДМАЭМА) с  $\bar{M}_w = 6 \cdot 10^4$  был любезно предоставлен Касаикиным (МГУ им. М. В. Ломоносова). Сополимер N-ваниллипирролидона с винилоктиламином (90 : 10,  $\bar{M}_w = 1,95 \cdot 10^4$ , ВП-ВННС<sub>8</sub>Н<sub>7</sub>) был синтезирован по методике, описанной в работе [15]. 6-Карбоксифлуоресцен (КФ) («Eastman», США) был предварительно очищен по методике работы [16]. [<sup>3</sup>H]-глюкоза фирмы «Amersham» (США), «Triton X-100 Serva» (ФРГ).

Все измерения проводили в фосфатно-солевом буферном растворе (0,01 м. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,14 м. NaCl) (ФБ).

Большие моноламеллярные липосомы получали методом обращения фаз [17]. Использованный в качестве маркера КФ ввели в липосомы в концентрации самотушения флуоресценции (0,2 м.). [<sup>3</sup>H]-глюкозу вводили в липосомы в виде ее раствора в 0,1 м. глюкозе ПЦМА вводили в липосомы на стадии их приготовления (в органической фазе).

Невключившийся маркер отделяли, осаждая липосомы центрифугированием (18 000 об/мин, 48 000 g, 15 мин, центрифуга «Beckman 2-21») в ФБ, процедуру повторяли трижды.

Проницаемость липосом оценивали по выходу из них маркера. В случае КФ за выходом красителя следили по увеличению флуоресценции суспензии липосом, так как внутри липосом КФ находится в концентрации самотушения флуоресценции. Измерения флуоресценции проводили на спектрофлуориметре SCF-500 «Aminco Bowman» (США) при поглощении на длине волны 490 нм и испускании на 520 нм. При использовании [<sup>3</sup>H]-глюкозы липосомы осаждали на центрифуге и определяли количество [<sup>3</sup>H]-глюкозы в супернатанте с помощью жидкосцинтилляционного счетчика «LKB Rackbeta II-1215» (Швеция).

Инкубацию липосом проводили следующим образом. Суспензию отмытых липосом добавляли к раствору полимера в ФБ или к ФБ, доведенным до соответствующего рН 0,1 н. NaOH или 0,1 н. HCl, при перемешивании. Количество вышедшего за определяемое время маркера измеряли как указано выше.

За 100% принимали флуоресценцию полностью разрушенных 0,1%-ным раствором «Triton X-100» липосом или активность суспензии липосом.

Ранее [13] было показано, что поликатион ПДМАЭМА практически не влияет на проницаемость липосом из цвиттер-ионного ДПФХ при рН 7,4, приводя лишь к некоторой стабилизации этих липосом в отношении выхода из них внутреннего маркера — КФ. Однако введение в бислой липосом отрицательно заряженного компонента (ДПФК) приводит к тем большему увеличению проницаемости таких липосом в присутствии поликатиона, чем большее количество кислоты входит в состав липосом. Результаты инкубирования заряженных (ДПФХ, 1 мол. % ДПФК) и незаряженных (ДПФХ) липосом в присутствии ПДМАЭМА представлены на рис. 1. Видно, что поликатион оказывает довольно слабое воздействие на липосомы из ДПФХ, вызывая их некоторую стабилизацию практически во всех исследованных областях рН. Однако для липосом, несущих эффективный отрицательный заряд за счет введенных в липидный бислой молекул ДПФК, поликатион приводит к увеличению количества вышедшего маркера.

На рис. 2 представлены результаты изучения влияния полианиона (ПМАК) на выход [<sup>3</sup>H]-глюкозы из липосом на основе ДПФХ. Полианион стабилизирует липосомы независимо от рН раствора, при котором полианион переходит из незаряженного (рН 2,0) в заряженное (рН 6,0) состояние, т. е. как в незаряженном, так и в заряженном состоянии. Аналогичным образом (рис. 1, a) действует на незаряженные липосомы поликатион. Наблюдаемое явление свидетельствует о том, что в основе стабилизирующего действия полианиона на проницаемость липосом лежат, по-видимому, гидрофобные взаимодействия метильных радикалов мономерных звеньев полимерной цепи с углеводородной фазой липидного бислоя, хотя это не исключает наличия и других типов взаимодействия полианион — фосфолипид, в частности электростатического. Придание липосомам эффективного положительного заряда путем введения в них

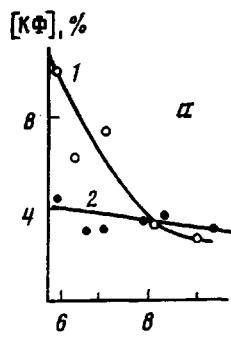


Рис. 1

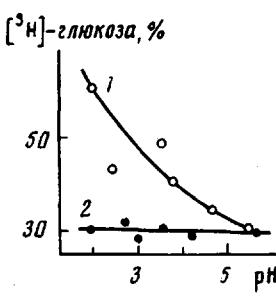
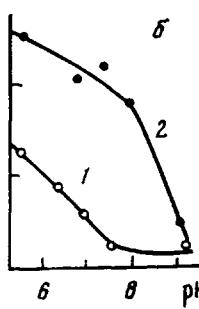


Рис. 2

Рис. 1. Инкубация липосом из ДПФХ (а) и ДПФХ с 1 мол.% ДПФК (б) в ФБ (1) и в растворе ПДМАЭМА в ФБ ( $M_{\text{ДПФХ}} : M_{\text{зв. ПДМАЭМА}} = 5 : 1$ ) (2) при различных рН; данные, представленные на этом и последующих рисунках, относятся к 20° и продолжительности 2 ч

Рис. 2. Инкубация липосом из ДПФХ в ФБ (1) или растворе ПМАК в ФБ ( $M_{\text{ДПФХ}} : M_{\text{зв. ПМАК}} = 1 : 1,5$ ) (2) при различных рН

5 мол.% стеариламина не вызывает изменения проницаемости липосом по отношению к включенной в них  $[^3\text{H}]$ -глюкозе в присутствии тех же количеств полианиона по сравнению с незаряженными липосомами.

В присутствии гребнеобразных полимеров, содержащих длинные алкильные боковые цепи в макромолекуле, несущей положительный заряд (ВП-BNHC<sub>8</sub>H<sub>17</sub>), либо не несущей заряда (ПЦМА), характер рН-зависимости проницаемости маркера из липосом существенно меняется. На рис. 3 представлены результаты инкубирования липосом из ДПФХ (3% ДПФК) в ФБ в отсутствие и в присутствии гребнеобразного поликатиона (сополимер ВП-BNHC<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) при различных рН. Видно, что рН-зависимость проницаемости маркера из таких липосом в присутствии гребнеобразного поликатиона имеет явно выраженный максимум при рН 7,0. При увеличении рН раствора до 7,4 или при уменьшении его до 6,5 скорость выхода из липосом инкапсулированного вещества резко падает. Таким образом, даже небольшое понижение рН раствора в физиологической области рН (от 7,4 до 7,0), имеющее наибольшее распространение при вышеупомянутых патологиях, приводит к значительному ускорению выхода включенного в липосомы вещества. Следует отметить, что все исследования были проведены в буферных растворах высокой ионной силы, близкой к физиологической. Это дает основания полагать, что использование комплексов с гребнеобразными поликатионами открывает принципиальную возможность создания липосомальных лекарственных форм целенаправленного действия, реагирующих на тонкие изменения кислотности среды резким увеличением скорости выхода из липосом лекарственного вещества.

Интересные результаты дает комбинированное воздействие на липосомы из ДПФХ гребнеобразного полимера — ПЦМА, введенного в липидный бислой, и поликатиона — ПДМАЭМА, добавляемого снаружи. Каждый из них по отдельности практически не повышает проницаемость липосом из ДПФХ, однако при совместном действии они приводят к резкому увеличению проницаемости липосом (маркер — КФ) при рН 7,5. Полученные результаты представлены на рис. 4. Из сравнения рис. 3 и 4 следует, что введение длинных боковых цепей гребнеобразного полимера в липидный бислой одинаковым образом сказывается на зависимости скорости выхода инкапсулированного в липосомы вещества от рН раствора как для незаряженного гребнеобразного полимера, так и для гребнеобразного поликатиона. Разницу в положении максимума при рН 7,0 для гребнеобразного поликатиона, добавленного в суспензию липосом, и рН 7,5 для комбинированного действия гребнеобразного незаряженного полимера внутри бислоя и линейного поликатиона на его поверхности можно объяснить, по-видимому, различием рК аминогрупп этих поликатионов.

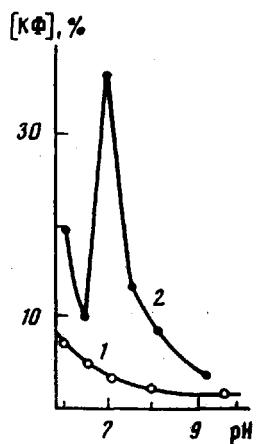


Рис. 3

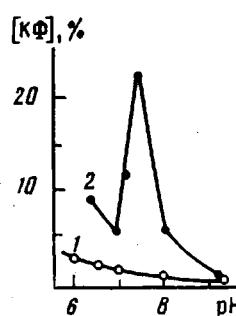
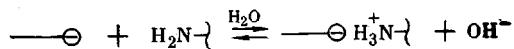


Рис. 4

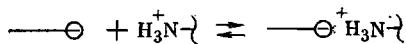
Рис. 3. Зависимости от pH количества вышедшего из липосом (ДПФХ с 3% ДПФК) КФ в ФБ (1) и в растворе ВП-ВННС<sub>8</sub>Н<sub>17</sub> в ФБ (2).  $M_{\text{ДПФХ}} : M_{\text{вн. ВННС}_8\text{Н}_{17}} = 1 : 2$

Рис. 4. Зависимости от pH количества вышедшего из липосом (ДПФХ с 9% ПЦМА) КФ в ФБ (1) и в растворе ПДМАЭМА в ФБ (2).  $M_{\text{ДПФХ}} : M_{\text{вн. ПДМАЭМА}} = 6 : 1$

Из сравнения данных рис. 3 и 4 с данными рис. 1, б следует, что в терминах электростатического взаимодействия поликатиона с противоположной заряженной поверхностью липосом можно объяснить лишь одну правую ветвь pH-зависимости проницаемости липосом на рис. 3 и 4. Как было показано ранее [12], с увеличением pH раствора в области pH выше 7,0–7,5 скорость выхода маркера из липосом уменьшается за счет разрушения электростатического комплекса между отрицательно заряженными группами на поверхности липосом и аминогруппами поликатиона в результате сдвига влево равновесия реакции обмена



и уменьшения степени ионизации аминогрупп полиэлектролита в реакции нейтрализации



Изменение знака кривизны правой ветви pH-зависимости проницаемости липосом по сравнению с рис. 1, б, а также наличие средней ветви на рис. 3 и 4 можно объяснить исключительно встраиванием алкильных боковых цепей гребнеобразных полимеров в липидный бислой при наличии процесса комплексообразования с поликатионом на поверхности липосом. Крайняя левая ветвь pH-зависимости проницаемости липосом в присутствии гребнеобразных полимеров может объясняться понижением стабильности липосом в данной области pH раствора, хотя действие гребнеобразных полимеров, безусловно, усугубляет этот процесс. Детальный механизм влияния боковых цепей гребнеобразных полимеров на pH-зависимость проницаемости липосом может объясняться только с учетом комплекса гидрофобного и электростатического взаимодействия липida и полимера и остается пока не совсем ясным.

Таким образом, существует принципиальная возможность регулирования проницаемости липосом в зависимости от pH среды. Увеличение проницаемости липосом может быть достигнуто в весьма узком интервале pH в физиологической ионной силе раствора. Это дает возможность создания липосомальных лекарственных форм целенаправленного действия, реаги-

рующих на небольшие изменения кислотности среды при различных патологиях резким изменением скорости выхода лекарственных веществ из липосом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Torchilin V. P.* // CRC Critical Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems. 1985. V. 2. Issue 1. P. 65.
2. *White J., Matlin K., Helenius A.* // J. Ceel Biol. 1981. V. 89. № 6. P. 674.
3. *Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д.* Липосомы и их взаимодействие с клетками. М., 1986. С. 240.
4. *Schneider H., Lemasters J. J., Höchli M., Hackenbrock C. R.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 1. P. 442.
5. *Gad A.* // Biochem. Biophys. Acta. 1983. V. 728. № 3. P. 377.
6. *Meyer K. A., Kummerling E. M., Altman L.* // Cancer Res. 1948. V. 8. № 6. P. 513.
7. *Yantvin M. B., Kreutz W., Horwitz B. A., Shinitzky M.* // Science. 1980. V. 210. № 12. P. 253.
8. *Turek A. B., Tirrell D. A.* // Polymer Preprints. 1982. V. 23. № 1. P. 53.
9. *Tirrell D. A.* // Proc. XII Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Materials. Geneva, 1985. P. 157.
10. *Фельдштейн М. М., Зезин А. Б.* // Молек. биология. 1974. Т. 8. № 2. С. 142.
11. *Фельдштейн М. М., Магросович М. Н., Зезин А. Б., Швец В. И.* // Биохимия. 1974. Т. 39. № 5. С. 1003.
12. *Petrushina O. O., Ivanov N. N., Feldstein M. N., Vasilev A. E., Plate N. A., Torchilin V. P.* // J. Controlled Rel. 1986. V. 3. № 2. P. 137.
13. *Максименко О. О., Иванов Н. Н., Фельдштейн М. М., Васильев А. Е., Торчилин В. П., Платэ Н. А.* // Биол. мембранны. 1986. Т. 3. № 7. С. 697.
14. *Петрухин Б. С.* Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1969. 140 с.
15. *Ануфриева Е. В., Панарин Е. Ф., Паутов В. Д., Соловский М. Б., Семисотков Г. В.* // Высокомолек. соед. А. 1977. Т. 19. № 12. С. 1329.
16. *Ralston E., Hjelmeland L. M., Klavsner R., Weinstein J. N., Blumenthal R.* // Biochem. Biophys. Acta. 1981. V. 649. № 1. P. 133.
17. *Szoka F., Papahadjopoulos D.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 9. P. 4194.

Всесоюзный научно-исследовательский  
институт биотехнологии

Поступила в редакцию  
16.XII 1986

#### pH-SENSITIVE LIPOSOMES ON THE BASIS OF COMPLEXES OF SYNTHETIC PHOSPHOLIPIDES WITH POLYELECTROLYTES AND COMB-LIKE POLYMERS

Maksimenko O. O., Fel'dshtein M. M., Panarin Ye. F.,  
Vasil'ev A. Ye., Torchilin V. P., Platé N. A.

#### Summary

Influence of polymers of various structure (polycation, polyanion, comb-like neutral polymer and comb-like polycation) on permeability of dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes for incorporated low-molecular markers – 6-carboxyfluoresceine and [<sup>3</sup>H]-glucose has been studied for various pH of the medium. The most effect of liposomes permeability is observed for comb-like polycation – copolymer of N-vinylpyrrolidone and vinyloctylamine which sharply increases the rate of exit of markers from liposomes at pH=7.0. In the presence of polycation – polydimethylaminoethyl methacrylate permeability of liposomes with introduced into the bilayer comb-like polycetyl methacrylate is also increased in the narrow pH range attaining the maximal values at pH=7.5.