

УДК 541(64+183.12):532.72

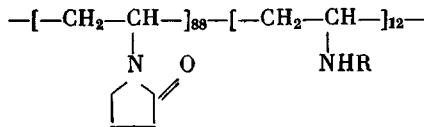
© 1990 г. О. О. Максименко, М. М. Фельдштейн, Е. Ф. Панарин,  
В. П. Торчилин, А. Е. Васильев, Н. А. Платэ

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ И ГИДРОФОБНЫХ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ГРЕБНЕОБРАЗНЫМИ  
ПОЛИКАТИОНАМИ И ЛИПИДАМИ НА ИЗМЕНЕНИЕ  
ПРОНИЦАЕМОСТИ ЛИПОСОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ  
ЗНАЧЕНИЯХ pH**

Изучено влияние гомологичных гребнеобразных поликатионов – сополимеров N-винилпирролидона с N-ванилкаптиламиналами на проницаемость при различных pH раствора отрицательно заряженных липосом из дипальмитоилфосфатидилхолина, содержащих дипальмитоилфосфатидовую кислоту. Наибольшее увеличение проницаемости липосом для маркеров 6-карбоксифлуоресцена и кальцеина наблюдается в случае сополимера N-винилпирролидона с N-ванилкаптиламином в узкой области pH около 7,0. Показано, что для пикообразного увеличения проницаемости липосом в нейтральных областях pH необходим баланс электростатических и гидрофобных взаимодействий между поликатионом и липидным бислойем. Увеличение вклада одного из этих взаимодействий приводит к утрате существенного и пикообразного изменения проницаемости липосом с изменением pH.

Ранее нами было показано, что комплексообразование полиэлектролитов с липосомами приводит к изменению проницаемости липосом для инкапсулированных веществ [1]. В зависимости от липидного состава липосом и структуры полимеров можно как увеличивать, так и уменьшать проницаемость липосом. Взаимодействие отрицательно заряженных липосом с гребнеобразным поликатионом – сополимером N-винилпирролидона с N-ванилкаптиламином приводит к резкому пикообразному увеличению проницаемости липосом при pH=7,0 [2]. Обнаруженное явление открывает принципиальную возможность создания липосомальных лекарственных форм на основе комплекса липосом с гребнеобразными поликатионами, реагирующих на небольшие отклонения величины pH среды по сравнению с физиологическим (pH=7,4) резким увеличением скорости высвобождения инкапсулированных лекарственных веществ. Механизм пикообразного увеличения проницаемости липосом при pH=7,0 остается не вполне ясным. Настоящая работа посвящена изучению влияния на проницаемость липосом в широком интервале pH ряда гомологичных гребнеобразных поликатионов, различающихся длиной боковых алкильных радикалов: сополимеров N-винилпирролидона (88 мол. %) с N-ваниламиналом и с N-ванилалкиламиналами (по 12 мол. %), где алкильный радикал – четный представитель гомологического ряда от C<sub>8</sub> до C<sub>14</sub> включительно.

Синтетический дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), дипальмитоилфосфатидовую кислоту (ДПФК) («Koch-Light», Великобритания) и Triton X-100 (ISN, США) использовали без предварительной очистки. 6-Карбоксифлуоресценин (КФ) («Eastman», США) и кальцеин («Koch-Light», Великобритания) предварительно очищали по методике [3]. Сополимеры N-винилпирролидона с N-ванилкаптиламиналами общей формулы



(R=H, C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>, C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>, C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>; M<sub>n</sub>=8·10<sup>4</sup>) синтезированы по методике [4].

Все измерения проводили в фосфатно-солевом буферном растворе (0,1 м.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,14 м.  $\text{NaCl}$ ) (ФБ).

Большие моноламеллярные липосомы диаметром 150–200 нм получали методом обращения фаз [5], суммарная концентрация липида составляла около 23 мг/мл. Маркеры вводили в липосомы в концентрациях самотушения флуоресценции (КФ – 0,2 моль/л, кальций – 0,127 моль/л). Невключившийся маркер отделяли, осаждая липосомы центрифугированием в ФБ (18 000 об/мин, 48 000 g, 15 мин, центрифуга «Beckman J-21», Швеция); процедуру повторяли трижды.

Размеры липосом и их комплексов с гребнеобразными поликатионами определяли методом лазерного светорассеяния на гoniометре *sp-81* фирмы ALV (Австрия) при угле измерения  $90^\circ$ ,  $\lambda=632,8$  нм,  $T=20^\circ$ . Концентрация липида в образцах составляла около 10 мкг/мл (количество липида определяли по методике [6]). Все расчеты были проведены В. А. Касакиным (МГУ им. М. В. Ломоносова) методом автокорреляционной функции флюктуации интенсивности рассеяния на коррелометре 109 T «Langly Ford» (Австрия). Коэффициент трансляционной диффузии рассчитывали из автокорреляционной функции флюктуации интенсивности рассеяния методом кумулянтов.

Проницаемость липосом оценивали по количеству вышедшего из них маркера. За выходом красителя следили по увеличению флуоресценции суспензии липосом, внутри которых маркер находился в концентрации самотушения флуоресценции. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре SPF-500 «Aminco Bowman» (США) при  $\lambda_{\text{пол}}=490$ ,  $\lambda_{\text{исп}}=520$  нм.

Инкубацию липосом проводили следующим образом. Суспензию отмытых от невключившегося маркера липосом добавляли к раствору полимера в ФБ или к ФБ, доведенному до соответствующего pH 0,1 н.  $\text{NaOH}$  или 0,1 н.  $\text{HCl}$  при перемешивании. Количество вышедшего за определяемое время маркера выражали в процентах от общего количества инкапсулированного маркера. За 100% принимали флуоресценцию липосом, полностью разрушенных 0,15%-ным раствором Triton X-100. Полученные отклонения при трехкратных измерениях укладывались в ошибку измерения флуоресценции и не превышали  $\pm 10\%$  от измеряемой величины.

Зависимости количества вышедшего за 120 мин из липосом маркера КФ от pH среды в присутствии гомологичных гребнеобразных поликатионов представлены на рис. 1. Низший представитель ряда – сополимер N-винилпирролидона с N-ваниламином, не имеющий алкильных радикалов у аминогруппы, оказывает стабилизирующее действие на проницаемость липосом, уменьшая количество вышедшего маркера (рис. 1, кривая 2). Следует отметить, что стабилизирующее действие этого полимера проявляется лишь при  $\text{pH} < 9,0$ , т. е. наблюдается в тех областях pH, в которых возможно электростатическое взаимодействие поликатиона с поверхностью липосом. С уменьшением pH раствора стабилизирующее действие поликатиона усиливается, что находится в полном соответствии с равновесием реакции электростатического комплексообразования [1] и может быть объяснено электростатической сорбцией макромолекул поликатиона на отрицательно заряженной поверхности липосом. Звенья N-винилпирролидона не оказывают воздействия на проницаемость липосом во всем изученном диапазоне pH раствора, и кривая pH-зависимости проницаемости липосом в присутствии поли-N-ванилпирролидона с  $M=3 \cdot 10^4$  не отличается от контроля в отсутствие полимера.

Зависимость количества маркера, вышедшего из липосом за 120 мин инкубации их в растворах сополимеров N-винилпирролидона с N-ванилоктиламином или N-ванилдецетиламином от pH раствора носит более сложный характер. Введение гребнеобразного поликатиона в суспензию отрицательно заряженных липосом приводит к увеличению проницаемости липосом по сравнению с контролем (без полимера) (рис. 1, кривые 3 и 4), однако кривая зависимости количества вышедшего из липосом маркера от pH раствора проходит через узкий максимум при  $\text{pH}=7,0$ , высота которого уменьшается с увеличением длины углеводородного радикала боковой цепи полизэлектролита, а ширина остается практически неизменной. Сдвиг pH раствора до 7,5 или 6,5 соответственно приводит к значительному снижению количества вышедшего из липосом маркера. Наличие правой ветви максимума на кривой pH-зависимости проницаемости липосом на кривых 3 и 4 (рис. 1) можно объяснить в терминах электростатического взаимодействия поликатиона с противоположно заряженной поверхностью липосом, поскольку при увеличении  $\text{pH} > 7,0 - 7,5$  равновесие кооперативной реакции комплексообразования между отрицательно заряженными группами на поверхности липосом и аминогруппами поликатиона, приво-

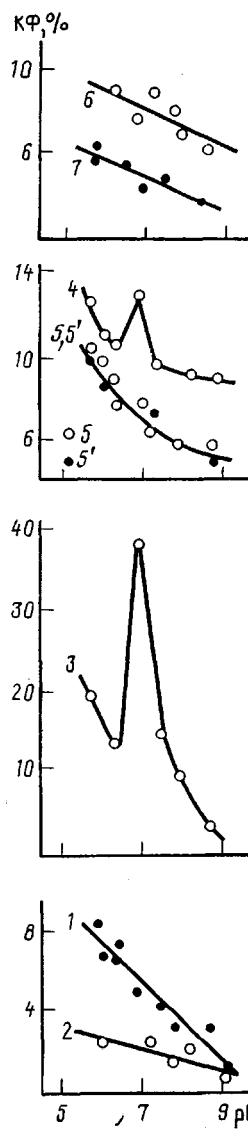


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость от pH количества КФ, вышедшего из липосом (ДПФХ, 1, 2, 4–7 – 7% ДПФК; 3 – 3% ДПФК). Условия инкубации: 20°, 120 мин. 1, 5, 7 – в среде ФБ; 2–6 – в растворе в ФБ сополимеров ВП с  $\text{BNHC}_n\text{H}_{2n+1}$ , где  $n=0$  (2), 8 (3), 10 (4), 12 (5) и 14 (6). Соотношение мольных концентраций  $M_{\text{ДПФК}} : M_{\text{BNHC}_n\text{H}_{2n+1}} = 1 : 2$  (2) и  $2 : 1$  (3–6)

Рис. 2. Зависимость от pH количества кальцеина, вышедшего из липосом (ДПФХ, 7% ДПФК). Условия инкубации: 60 мин, 20°. 1 – в среде ФБ; 2 – в растворе в ФБ сополимера ВП –  $\text{BNHC}_8\text{H}_{17}$ . Соотношение мольных концентраций  $M_{\text{ДПФХ}} : M_{\text{BNHC}_8\text{H}_{17}} = 1 : 1$

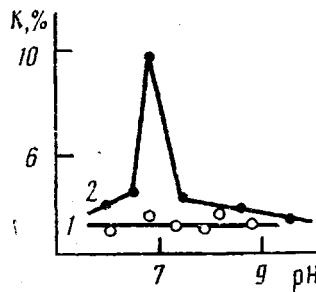


Рис. 2

дящей к увеличению проницаемости липосом, сдвигается в сторону образования исходных продуктов [1].

Наличие крайней левой ветви на кривых 3 и 4 рис. 1, ранее объясняемое нами как следствие нестабильности липосом в кислых областях pH, следует, по-видимому, отнести за счет уменьшения флуоресценции внутреннего маркера КФ при  $\text{pH} < 7.0$ . Действительно, инкубация липосом аналогичного состава (ДПФХ, 7% ДПФК), содержащих в качестве внутреннего маркера кальцеин, интенсивность флуоресценции которого практически не изменяется в интервале pH от 6,0 до 10,0, в ФБ и в растворе ВП –  $\text{BNHC}_8\text{H}_{17}$  при различных pH (рис. 2) показала, что на кривых pH-зависимости проницаемости липосом крайние ветви отсутствуют. При этом наблюдался некоторый сдвиг максимума на кривой pH-зависимости ( $\text{pH} \sim 6.7$ ).

Дальнейшее увеличение длины углеводородных радикалов боковых цепей гребнеобразных поликатионов до 12 (сополимер N-винилпирролидона с N-венилдодециламином, рис. 1, кривая 5) и 14 метиленовых звеньев (сополимер N-винилпирролидона с N-венилтетрадециламином, рис. 1, кривая 6), т. е. усиление вклада гидрофобных взаимодействий в процесс

комплексообразования липосом с полимером, приводит сначала к утрате влияния поликатиона на проницаемость липосом для КФ (рис. 1, кривая 5 совпадает с контролем, точки 5'), а затем снова к увеличению их проницаемости (рис. 1, кривая 6). Следует обратить внимание на параллельность кривых зависимости проницаемости липосом для КФ от pH раствора в присутствии и в отсутствие сополимера ВП – BNHC<sub>14</sub>H<sub>29</sub> (рис. 1, кривые 6 и 7), указывающую на независимость от pH среды вклада гребнеобразного поликатиона с длинными боковыми цепями в увеличение проницаемости липосом. Так как с увеличением длины углеводородных боковых радикалов гребнеобразного поликатиона можно ожидать усиления гидрофобных взаимодействий между боковыми цепями сополимера и углеводородными цепями лицида, отсутствие зависимости увеличения проницаемости липосом от pH можно объяснить преобладанием вклада гидрофобных взаимодействий в процесс комплексообразования тетрадецильных боковых радикалов поликатиона с липосомами по сравнению с вкладом pH чувствительных электростатических взаимодействий между аминогруппами поликатиона и отрицательными зарядами на поверхности липосом.

Влияние гребнеобразных поликатионов на проницаемость отрицательно заряженных липосом можно объяснить с учетом конформаций макромолекул полимера в водных и водно-солевых растворах. В работах [4, 7] методом поляризованной люминесценции сополимеров N-винилпирролидона с N-венилалкиламиналами, содержащими ковалентно поляризованный люминесцирующую метку (диметиламинонафталинсульфамидная группа в количестве одна метка на 125 звеньев сополимера), было показано, что эти сополимеры по внутримолекулярной подвижности делятся на две группы. В первую группу входят сополимеры ВП – BNH<sub>2</sub> и ВП – BNHR с R=C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> и C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>. Значения их внутримолекулярной подвижности, охарактеризованные временами релаксации  $\tau_w$ , в водном растворе и в 0,25 м. растворе NaCl близки (20–24 нс), что свидетельствует о практически неограниченной подвижности углеводородных радикалов боковых цепей сополимера и об отсутствии существенного взаимодействия между ними. Это характерно для полиэлектролитов, имеющих конформацию развернутого клубка, в котором все боковые алкильные радикалы в одинаковой степени доступны для включения в липидный бислой в результате электростатической сорбции макромолекулы поликатиона на отрицательно заряженной поверхности липосомы.

Внутримолекулярная подвижность люминесцентной метки, присоединенной к высшим алкильным заместителям в боковых цепях сополимера (додецильному и цетильному радикалам) оказывается существенно заторможенной ( $\tau_w=67-147$  нс), что обуславливает глобулярную конформацию макромолекул, в которых алкильные боковые цепи образуют внутримолекулярную мицеллу за счет сильного гидрофобного взаимодействия. Так как критическая концентрация внутримолекулярного мицеллообразования высших алкильных боковых радикалов макромолекулы гребнеобразного поликатиона тем ниже, чем длинее боковые цепи, при постоянных степенях полимеризации макромолекулы и количестве алкильных боковых радикалов, т. е. при постоянной концентрации алкильных радикалов в объеме, занимаемом макромолекулой, все додецильные радикалы сополимера ВП – BNHC<sub>12</sub>H<sub>25</sub> будут включены во внутримолекулярную мицеллу. Часть же тетрадецильных радикалов сополимера ВП – BNHC<sub>14</sub>H<sub>29</sub> окажется свободной и будет склонна к агрегации с углеводородными радикалами соседних макромолекул гребнеобразного поликатиона либо с углеводородными радикалами липидов в липосоме. Тогда сополимер ВП – BNHC<sub>12</sub>H<sub>25</sub> не должен проявлять склонности к комплексообразованию с липосомами за счет гидрофобных взаимодействий боковых цепей с углеводородными радикалами липидов бислоя липосомы, а сополимер ВП – BNHC<sub>14</sub>H<sub>29</sub> окажется способным к такому комплексообразованию. В результате сополимер ВП – BNHC<sub>12</sub>H<sub>25</sub> не должен оказывать влияния на структуру бислоя и проницаемость липосом, однако гидрофобное комплексообразование гребнеобразного сополимера с липосомами должно утратить pH-зависимый характер, что наблюдается в эксперименте (рис. 1, кривые 5 и 6).

Из приведенных данных следует, что для создания pH чувствительных липосом на основе комплексов липосом с гребнеобразными поликатионами, способными реагировать на небольшие изменения pH среды в физиологической области ( $\text{pH}=6,5-7,5$ ) резким изменением проницаемости, необходимо оптимальное соотношение вкладов электростатического и гидрофобного взаимодействий между гребнеобразным поликатионом и липосомами. Для изученных гомологов гребнеобразных поликатионов такое оптимальное соотношение вкладов электростатического и гидрофобного взаимодействий может быть достигнуто при длине алкильного радикала боковой цепи гребнеобразного поликатиона, соответствующей восьми метиленовым звеньям. Изменение баланса вкладов электростатического взаимодействия между гребнеобразным поликатионом и липидным бислоем липосом в образование комплекса приводит к утрате острого пика на кривых зависимости проницаемости липосом от pH.

#### Список литературы

1. Petrukhina O. O., Ivanov N. N., Feldshtein M. M., Vasiliev A. E., Torchilin V. P., Plate N. A. // Controlled Release. 1986. V. 3. № 2. P. 137.
2. Максименко О. О., Фельдштейн М. М., Панарин Е. Ф., Васильев А. Е., Торчилин В. П., Платэ Н. А. // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 30. № 5. С. 1120.
3. Ralston E., Hjeltneland L. M., Klausner H., Weinstein I. N., Blumenthal R. // Biochem. Biophys. Acta. 1981. V. 649. № 1. P. 133.
4. Ануфриева Е. В., Панарин Е. Ф., Паутов В. Д., Соловский М. В., Семисотнов Г. В. // Высокомолек. соед. А. 1977. Т. 19. № 12. С. 1329.
5. Szoka F., Papahadjopoulos D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 9. P. 4194.
6. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г., Батраков С. Г., Бареков Л. И., Проказова Н. В. Препартивная биохимия липидов. М., 1981. С. 61.
7. Ануфриева Е. В., Панарин Е. Ф., Паутов В. Д., Семисотнов Г. В. // Высокомолек. соед. Б. 1979. Т. 21. № 1. С. 51.

Всесоюзный научно-исследовательский  
институт биотехнологии

Всесоюзный кардиологический научный  
центр АМН СССР

Поступила в редакцию  
25.12.89

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

#### INFLUENCE OF ELECTROSTATIC AND HYDROPHOBIC INTERACTIONS BETWEEN COMB-LIKE POLYCATIONS AND LIPIDES ON THE CHANGE OF PERMEABILITY OF LIPIDES AT VARIOUS pH

#### Summary

Influence of homological comb-like polycations being copolymers of N-vinylpyrrolidone with N-vinylalkylamines on permeability of negatively charged dipalmitoylphosphatidylholine liposomes containing dipalmitoylphosphatide acid has been studied at various pH of a solution. The most increase of liposomes permeability for the 6-carboxyfluoresceine and calcine markers is observed for the copolymer of N-vinylpyrrolidone with N-vinyloctylamine in the narrow pH range near 7.0. The peak-like increase of liposomes permeability in neutral media is shown to demand the balance of electrostatic and hydrophobic interactions between the polycation and lipid bilayer. An increase of the contribution of one of these interactions results in the loss of the essential and peak-like change of liposomes permeability with the change of pH.