

МГУ имени М.В. Ломоносова

Кафедра высокомолекулярных соединений

№ госрегистрации
122011800178-3

УТВЕРЖДАЮ
Директор/декан

«__» _____ Г.

УДК
542 Практическая лабораторная химия, препаративная и эксперимен-
тальная химия
химия (устаревший)

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Живые системы, медицинские технологии, медицинская химия и новые
лекарственные средства

по теме:

Ансамбли циклодекстринов на малых липосомах - высокоэффективные
наноконтейнеры для доставки гидрофобных соединений
(промежуточный)

Зам. директора/декана
по научной работе

«__» _____ Г.

Руководитель темы
Сыбачин А.В.

«__» _____ Г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:

старший научный сотрудник, _____ (Сыбачин А.В.)
кандидат химических наук

Исполнители темы:

инженер 1-ой категории _____ (Пигарева В.А.)
старший научный сотрудник, _____ (Спиридонов В.В.)
кандидат химических наук
инженер 1-ой категории _____ (Степанова Д.А.)

РЕФЕРАТ

Ключевые слова:

фолиевая кислота, куркумин, карбоксиметилциклодекстрины, липосомы, адсорбция, молекулярные ансамбли, биологически активные вещества, наноконтейнеры

Ключевые слова по-английски:

carboxymethylcyclodextrins, bioactive compounds, adsorption, liposomes, nanocontainers, curcumin, folic acid, molecular ensembles

Методом экструзии, а также методом ультразвуковой гомогенизации были получены серии катионных липосом из электронейтрального липида - диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ), и катионного липида - диолеилтриметиламмоний хлорида (ДОТАП). Мольная доля катионного липида (v) варьировалась от 0 до 0.3. Размеры липосом варьировались от 60 до 180 нм. За взаимодействием анионных карбоксиметилциклодекстринов (КМЦД) и катионных липосом следили методом лазерного микроэлектрофореза. Параллельно методом динамического светорассеяния проводили измерение размеров частиц. Для электронейтральных липосом ($v = 0$) добавление раствора КМЦД не приводило к изменению значений ЭФП, при этом изменение размера частиц также не фиксировалось. Добавление раствора КМЦД к 1 мг/мл суспензии положительно заряженных липосом с $v = 0.3$ приводило к уменьшению значения ЭФП с $+5.5$ (мкм/с)/(В/см) до $+2.4$ (мкм/с)/(В/см) при концентрации КМЦД 1.25 мг/мл. Таким образом, можно сделать вывод об электростатической природе адсорбции КМЦД на поверхность катионных липосом. Следует отметить, что параллельное измерение размера частиц показало, что изменения размеров липосом не наблюдается вплоть до концентрации КМЦД 1 мг/мл - размер частиц в системе соответствовал диаметру исходных липосом 150 нм. Незначительное увеличение размера до 200 нм было зарегистрировано при концентрации КМЦД 1.25 мг/мл. При этом дальнейшее увеличение концентрации КМЦД приводило к резкой агрегации системы. В свою очередь, значения ЭФП практически не менялись. Дополнительная информация о характере взаимодействия КМЦД и катионных липосом и составе комплексов была получена методом кондуктометрии. Добавление раствора КМЦД к суспензии катионных липосом с $v = 0.3$ привело к резкому увеличению (по отношению к контролю в системе без липосом) электропроводности системы в интервале концентраций КМЦД вплоть до 1.25 мг/мл. Дальнейшее увеличение концентрации КМЦД приводило к росту электропроводности, соответствовавшему увеличению концентрации свободных молекул КМЦД. Из полученных данных был произведён расчёт состава насыщенного молекулами КМЦД комплекса КМЦД/липосома. Состав (N) определяли как число молекул КМЦД, приходящихся на одну молекулу ДОТАП. Для липосом с $v = 0.3$ N составляло 2.5. В то время как для липосом с $v = 0.15$ N равнялось 2. Такое незначительное отличие может быть объяснено, что фактором, лимитирующим адсорбцию КМЦД является геометрический параметр, а не электростатический. Анализ строения межфазного комплекса, а также его визуализация были осуществлены методом атомно-силовой микроскопии на планарных липидных бислоях на подложке. Было установлено, что высота структур, формируе-

мых на бислой молекулами КМЦД составляет в среднем до 2.5 нм. Очевидно, что олигосахариды формируют ассоциаты на поверхности бислоя. Принимая во внимание, что высота молекулы бета-циклодекстрина составляет 0.78 нм, можно рассчитать, что количество слоёв КМЦД в ассоциате может составлять до четырёх. Для исследования возможности взаимодействия комплексов ДОТАП/ДОФХ липосомы/ КМЦД с клетками были использованы отрицательно заряженные модельные клеточные мембраны- двухмикронный латекс, покрытый липидным бислоем (ЛПБ). На первом этапе методом лазерного микроэлектрофореза была изучена адсорбция катионных ДОТАП/ДОФХ липосом на поверхность ЛПБ. С увеличением концентрации липосом в системе ЭФП частиц ЛПМ уменьшалось по модулю от изначального значения – 0.5 (мкм/с)/(В/см) до нулевого значения с последующей перезарядкой до значений ЭФП +3 (мкм/с)/(В/см). Это свидетельствует о электростатической адсорбции катионных липосом на поверхность ЛПБ. Далее рассматривали комплекс КМЦД/липосомы, в котором количество КМЦД составляло 25% от необходимого для формирования насыщенного комплекса. При этом комплекс имел исходный высокий поверхностный заряд (ЭФП = +4 (мкм/с)/(В/см)). Добавление комплекса к суспензии ЛПБ также приводило к нейтрализации исходного анионного заряда ЛПБ с последующей перезарядкой поверхности. Однако, точка нейтрализации наблюдалась при больших концентрациях комплекса по отношению к исходным липосомам в расчёте на концентрацию липидов. Также, максимальное значение ЭФП перезаряженного комплекса составляло + 1.8 (мкм/с)/(В/см). Полученные результаты позволяют утверждать, что десорбции КМЦД при адсорбции комплекса на ЛПБ не наблюдается и комплекс реагирует с биомиметической мембраной как единое целое. Визуализация адсорбции комплексов КМЦД/липосомы на биомиметические мембраны была осуществлена методом флуоресцентной микроскопии. С этой целью использовали биомиметические мембраны на основе пятимикронных микросфер, покрытых липидным бислоем, (МПБ). Для визуализации использовали ДОТАП/ДОФХ липосомы, меченные пиреном. Для суспензии МПБ в оптический канал были видны микросферы со средним диаметром 5 микрон, в то время как во флуоресцентном канале не наблюдалось сигналов. Затем к суспензии МПБ добавляли суспензию комплекса КМЦД/липосом и анализировали на микроскопе. На микрофотографии, полученном в оптическом канале видны отдельные частицы, соответствующие МПБ. На снимке этой же области в флуоресцентном режиме микроскопа видно наличие синего цвета на всей поверхности БСЛМ, отражающее присутствие меченных пиреном объектов, т.е. комплексов КМЦД/липосомы, адсорбированных на МПБ. Для молекул КМЦД были оценены возможности включения гидрофобных биологически активных молекул: фенолфталеина, куркумина, фолиевой кислоты и паклитаксела. Установлено, что благодаря наличию ароматических фрагментов у органических молекул формируются комплексы с КМЦД по принципу хозяин-гость эквимольного состава для всех исследованных молекул, кроме куркумина, для растворения которого в воде требуется 2 молекулы КМЦД. Было обнаружено, что на катионные липосомы адсорбция молекул КМЦД с включенными биологическими соединениями происходит с такой же закономерностью, как и для «пустых» КМЦД. Было установлено, что характер адсорбции КМЦД на поверхность катионных липосом не зависит от диаметра везикул. Устойчивость комплексов к КМЦД/липосомы к диссоциации в

водно-солевых средах исследовали методами динамического светорассеяния, а также методом лазерного микроэлектрофореза. Было установлено, что и для липосом с $v = 0.15$, и для липосом с $v = 0.3$ при физиологическом значении ионной силы диссоциации комплексов не наблюдалось. Таким образом, исследуемые системы сохраняют стабильность в физиологических средах и представляют интерес для создания на их основе средств доставки биологически активных соединений. С помощью классического МТТ-теста была исследована цитотоксичность КМЦД, катионных липосом их комплексов на клетках карциномы молочной железы. Было установлено, что исследуемые объекты, как и комплекс КМЦД/липосомы не обладают цитотоксичностью вплоть до максимальных исследованных концентраций – 2 мг/мл. При этом, включение в наноконтейнер КМЦД/липосомы антибиотика паклитаксела приводило к проявлению цитотоксичности при концентрации антибиотика в 5 раз меньшей, чем для аптечной формы, и в 4 раза меньше, чем для мицеллярной формы, полученной путём включения паклитаксела в катионные смешанные полилактидные мицеллы на основе полилактида, терминированного аминогруппой, и блок-сополимеров лактида и этиленоксида. Полученные результаты демонстрируют, что формирование ансамблей КМЦД на катионных липосомах позволяет добиться значительной концентрации гидрофобных биологически активных молекул за счёт их включения в полость КМЦД. При этом формирование таких наноконтейнеров обеспечивает высокий терапевтический (противораковый) эффект по сравнению с действующими антибиотиками.

ВВЕДЕНИЕ

Циклодекстрины (ЦД) находят широкое применение в качестве контейнеров для включения соединений различной химической природы по принципу хозяин-гость: формирование комплексов подчиняется закону геометрического соответствия между размером внутренней полости ЦД и размерами гостевых молекул [P. Saokham et al., *Molecules*. 23 (2018) 1161]. Особенно важной является способность ЦД солюбилизировать нерастворимые в воде биологически- активные соединения, что обеспечивает повышение биодоступности, стабильности лекарственных препаратов, снижение их побочной токсичности и пролонгации циркулирования в кровотоке [C. Schönbeck et al., *Mol Pharm.* 16 (2019) 648; S.B. Carneiro et al., *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 642]. Отличительной особенностью ЦД является их высокая константа связывания с липидными мембранами в том числе и за счёт водородных связей, ван-дер-Ваальсовых и π - π -взаимодействий [Z. Hammoud Z. et al., *Int. J. Pharm.* 564 (2019) 59; A. A. Скуредина и др., *Биоорганическая химия* 46 (2020) 505]. В ходе данной работы мы планируем использовать эту способность ЦД для формирования ансамблей ЦД на липидных мембранах малых моноламеллярных липосом. Таким образом мы используем оригинальный подход к использованию классических свойств ЦД для формирования наноконтейнера, аккумулирующего ЦД в малом объёме за счёт формирования молекулярных ансамблей на липосомах.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Катионные липосомы получали следующим способом. В круглодонной колбе смешивали рассчитанное количество электронейтрального и катионного липида, предварительно растворённых в смеси хлороформ:метанол 1:1. В качестве электронейтрального липида использовали диолеоилфосфатидилхолин (ДОФХ), а в качестве катионного липида был использован диолеоилтриметиламмоний хлорид (ДОТАП). Мольная доля ДОТАП в смеси рассчитывалась по формуле $v = [\text{ДОТАП}] / ([\text{ДОФХ}] + [\text{ДОТАП}])$ и варьировалась в ходе экспериментов от 0 до 0,3. Органический растворитель из смеси липидов удаляли на вакуумном роторном испарителе при температуре 35 °С. Полученную липидную плёнку диспергировали в 0,01 М Трис-буферном растворе. Далее суспензию липосом подвергали гомогенизации на шприцевом экструдере через пористую поликарбонатную мембрану. Размер получаемых липосом определялся диаметром пор мембраны. Диаметры используемых мембран составляли 200 нм, 100 нм и 50 нм. В результате были получены липосомы со средними размерами от 180 до 90 нм, соответственно. Полученные липосомы использовали в течение 1-2 дней. Концентрация получаемых липосом составляла 20 мг/мл. Эта же процедура была использована для получения флуоресцентно меченных липосом, но к смеси липидов в органическом растворителе добавляли 0,1 мол% флуоресцентно меченного липида – диолеоилфосфоэтаноламина, ковалентно меченного пиреном (ДОФЕ-Пирен). Для получения катионных липосом меньшего размера, а также для получения анионных липосом, где в качестве анионного липида использовали натриевую соль диолеоилфосфатидилглицерола (ДОФГ), использовали метод ультразвукового диспергирования. Липидную плёнку из смеси липидов рассчитанного состава получали по процедуре, описанной выше. Полученную липидную плёнку диспергировали в 0,01 М Трис-буферном растворе, затем суспензию подвергали воздействию ультразвукового гомогенизатора (2×300 с) с титановым наконечником при частоте 20 кГц и постоянном охлаждении водой комнатной температуры. Титановую пыль отделяли центрифугированием при скорости 10000 об/мин в течение 5 мин. Полученные липосомы использовали в течение 1-2 дней. Средний размер полученных таким способом липосом составлял 50-60 нм. Концентрация получаемых липосом составляла 10 мг/мл. В качестве системы сравнения для оценки действия противоопухолевого антибиотика – паклитаксела, включённого в комплекс КМЦД/липосомы, были синтезированы катионные смешанные полилактидные мицеллы из блок-сополимера лактида и этиленоксида (средние массы блоков составляли 2000 и 2000 соответственно) –ПЛА-ПЭГ, и полилкатаида, терминированного аминокислотой (со средней массой 2500)- ПЛА-NH₂. Полилактидные мицеллы со включённым паклитакселом получали по следующей методике: Сначала взвешивали 9,25 мг ПЛА-NH₂, 34,6 мг ПЛА-ПЭГ и 2,3 мг/мл паклитаксела помещали в круглодонную колбу. Затем в колбу добавляли 3 мл ТГФ для растворения полилактидов. Затем органический растворитель выпаривали при 37 °С в вакууме с использованием роторного испарителя. Полученную плёнку гидратировали 2,19 мл деионизированной воды и ультразвуковым диспергатором с частотой 20 кГц и значение амплитуды 20% в течение 10 мин. В результате была получена суспензия мицелл с молярным соотношением ПЛА-NH₂/ПЛА-ПЭГ 3:7 и концентрацией 20 мг/мл, массовая доля паклитаксела

составляла 5%. Все эксперименты проводили в буфере Трис с рН 7. Исследуемый олигосахарид- карбоксиметилциклодекстрин (КМЦД) представлял собою натриевую соль частично замещённого бета-циклодекстрина. Степень замещения по данным производителя составляла 3. За взаимодействием анионных карбоксиметилциклодекстринов (КМЦД) и катионных липосом следили методом лазерного микроэлектрофореза. Для этого к суспензии липосом порционно добавляли раствор циклодекстринов и регистрировали изменение электрофоретической подвижности (ЭФП) системы. Параллельно методом динамического светорассеяния проводили измерение размеров частиц. Для электронейтральных липосом ($v = 0$) со средним размером 90 нм добавление раствора КМЦД не приводило к изменению значений ЭФП, при этом изменения размера частиц также не фиксировалось. Добавление раствора КМЦД к 1 мг/мл суспензии положительно заряженных липосом с $v = 0.3$ приводило к уменьшению значения ЭФП с 5.5 (мкм/с)/(В/см) до 2.4 (мкм/с)/(В/см) при концентрации КМЦД 1.25 мг/мл. Таким образом, можно сделать вывод об электростатической природе адсорбции КМЦД на поверхность катионных липосом. Следует отметить, что параллельное измерение размера частиц показало, что изменения размеров липосом не наблюдается вплоть до концентрации КМЦД 1 мг/мл- размер частиц в системе соответствовал диаметру исходных липосом 150 нм. Учитывая, что линейные размеры молекулы КМЦД не превышают 1 нм, отсутствие изменения в размерах частиц указывает на отсутствие агрегатов в системе, но не позволяет анализировать размеры адсорбционного слоя олигосахаридов. Незначительное увеличение размера до 200 нм было зарегистрировано при концентрации КМЦД 1.25 мг/мл. При этом дальнейшее увеличение концентрации КМЦД приводило к резкой агрегации системы. В свою очередь, значения ЭФП практически не менялись. Дополнительная информация о характере взаимодействия КМЦД и катионных липосом и составе комплексов была получена методом кондуктометрии. Для этого была получена контрольная зависимость электропроводности 0.001 М Трис буфера в зависимости от концентрации добавленного КМЦД. Как и следовало ожидать для заряженных молекул, значения электропроводности линейно возрастали с ростом КМЦД. Добавление раствора КМЦД к суспензии катионных липосом с $v = 0.3$ привело к резкому увеличению (по отношению к контролю) электропроводности системы в интервале концентраций КМЦД вплоть до 1.25 мг/мл. Такой характер зависимости может быть объяснен тем, что при формировании электростатического комплекса происходит высвобождение противоионов КМЦД и ДОТАП- катионов натрия и хлорид анионов, соответственно, которые в значительной степени увеличивают электропроводность системы, обладая большей подвижностью, чем в связанном виде. Дальнейшее увеличение концентрации КМЦД приводило тому, что рост электропроводности соответствовал приросту, определяемому свободными молекулами КМЦД (участок зависимости был параллелен контролю). На основании полученных данных можно рассчитать состав насыщенного комплекса. Принимая во внимание, что характер взаимодействия КМЦД с катионными липосомами сходен с характером адсорбции полиэлектролитов на противоположно заряженные поверхности (латексы, липосомы, микросферы и пр.), расчёт проводили исходя из предположения, что все молекулы КМЦД адсорбируются на липосомы вплоть до образования насыщенного комплекса и только после этого начинают накапливаться в системе в сво-

бодной форме. Состав определяли как число молекул КМЦД, приходящихся на одну молекулу ДОТАП: $N = [KMCD]/([DOTAP]) = (SKMCD/MKMCD)/(0.3 \times Slip/Mlip)$ Где [КМЦД] и [ДОТАП] – мольные концентрации КМЦД и ДОТАП, SKMCD – массовая концентрация КМЦД, MKMCD – средняя молярная масса КМЦД, Slip – массовая концентрация липидов, Mlip – средняя молярная масса липида, рассчитанная как $0.3 \times M_{DOTAP} + 0.7 \times M_{DOFX}$ В результате, среднее значение N составило 2.5 ± 0.5 . Метод динамического светорассеяния не позволяет проанализировать размер слоя олигосахаридов на поверхности катионных липосом диаметром 150 нм, поэтому для анализа строения межфазного комплекса, а также для его визуализации был использован метод атомно-силовой микроскопии. С этой целью по классической методике из катионных липосом были приготовлены планарные липидные бислои на подложке, в качестве которой была использована модифицированная слюда [Biophys. J. 2005, 88, 3422–3433]. Исходная слюда имеет отрицательный заряд, поэтому при адсорбции катионных липосом положительно заряженные липиды распределяются преимущественно на обращённом к подложке монослое. Для того, чтобы избежать этого эффекта, свежеочищенную слюду помещали в 1 М раствор хлорида кальция на 24 часа, а затем отмывали избыток соли. Полученная в результате подложка несла положительный заряд, за счёт адсорбированных ионов Ca^{2+} . На модифицированную подложку наносили 30 мкл суспензии катионных липосом концентрации 20 мг/мл, после 2 мин инкубирования неадсорбированные липосомы удаляли методом спин-коатинга (spin-coating). Формирование планарных липидных бислоев на подложке подтверждали анализом рельефа поверхности и толщины формируемых структур, которая составляла примерно 4 нм, что соответствует толщине липидного бислоя. Раствор КМЦД концентрации 1.25 мг/мл был нанесён на поверхность свежеприготовленного бислоя на подложке, и после пятиминутного инкубирования неадсорбированные молекулы КМЦД были удалены спин-коатингом. Затем комплекс был дополнительно промыт буфером. Анализ морфологии КМЦД на липидном бислое проводили в полуконтактном режиме с использованием кремниевых кантилеверов. Было установлено, что высота структур, формируемых на бислое молекулами КМЦД составляет в среднем до 2.5 нм (см. Рисунок 1). Очевидно, что олигосахариды формируют ассоциаты на поверхности бислоя. Принимая во внимания, что высота молекулы бета-циклодекстрина составляет 0.78 нм, можно рассчитать, что количество слоёв КМЦД в ассоциате может составлять до четырёх. Для исследования возможности взаимодействия комплексов ДОТАП/ДОФХ липосомы/ КМЦД с клетками были использованы модельные клеточные мембраны, которые получали по следующей процедуре. К суспензии двухмикронного латекса концентрации 2 мг/мл добавляли суспензию анионных ДОФГ/ДОФХ липосом концентрации 2.5 мг/мл и интенсивно перемешивали на вортексе в течение 30 мин. Липосомы, адсорбируясь на поверхность латекса разрушаются, формируя покрытие из липидного бислоя, что неоднократно было продемонстрировано в литературе. Избыток неадсорбированных липосом отмывали путём многократного центрифугирования и отделения супернатанта с последующим ресуспендированием латекса, покрытого липидным бислоем (ЛПБ). На первом этапе методом лазерного микроэлектрофореза была изучена адсорбция катионных ДОТАП/ДОФХ липосом на поверхность ЛПБ. С увеличением концентрации липосом в системе ЭФП частиц ЛПМ уменьшалось по мо-

дулю от изначального значения $-0.5 \text{ (мкм/с)/(В/см)}$ до нулевого значения с последующей перезарядкой до значений ЭФП $+3 \text{ (мкм/с)/(В/см)}$. Это свидетельствует о электростатической адсорбции катионных липосом на поверхность ЛПБ. Далее рассматривали комплекс КМЦД/липосомы, в котором количество КМЦД составляло 25% от необходимого для формирования насыщенного комплекса. При этом комплекс имел исходный высокий поверхностный заряд (ЭФП $= +4 \text{ (мкм/с)/(В/см)}$). Добавление комплекса к суспензии ЛПБ также приводило к нейтрализации исходного анионного заряда ЛПБ с последующей перезарядкой поверхности. Однако, точка нейтрализации наблюдалась при больших концентрация комплекса по отношению к исходным липосомам в расчёте на концентрацию липидов. Также, максимальное значение ЭФП перезаряженного комплекса составляло $+1.8 \text{ (мкм/с)/(В/см)}$. В случае, если бы при адсорбции комплекса на поверхность ЛПБ наблюдалась бы десорбция молекул КМЦД с поверхности комплекса в результате конкурентных реакций с отрицательно заряженной поверхностью, то профили кривых зависимостей ЭФП от концентрации липидов для исходных липосом и комплекса КМЦД/липосомы совпадали бы. Однако, полученные результаты позволяют утверждать, что существенной десорбции КМЦД при адсорбции комплекса на ЛПБ не наблюдается и комплекс реагирует с биомиметической мембраной как единое целое. Визуализация адсорбции комплексов КМЦД/липосомы на биомиметические мембраны была осуществлена методом флуоресцентной микроскопии. С этой целью биомиметические мембраны готовили на основе планарных бислоёв на подложке, в роли которой выступали борсиликатные микросферы диаметром 5 микрон. Модификация микросфер бислоем осуществлялась по методике, описанной выше для латекса, путём ободки суспензии микросфер суспензией анионных липосом. В результате были получены микросферы, покрытые липидным бислоем, (МПБ). Для визуализации использовали ДОТАП/ДОФХ липосомы, содержавшие 0.1 вес.% ДОФЕ-Пирен. Аликвоту суспензии объёмом 10 мкл наносили на предметное стекло и анализировали. Изображения микросфер получали в оптическом и флуоресцентном канале микроскопа (при УФ-фильтре возбуждения флуоресценции). Для суспензии МПБ в оптический канал были видны микросферы со средним диаметром 5 микрон, в то время как во флуоресцентном канале не наблюдалось сигналов (Рисунок 2а и б, соответственно). Затем к суспензии МПБ добавляли суспензию комплекса КМЦД/липосом, в котором количество КМЦД составляло 25% от необходимого для формирования насыщенного комплекса. После перемешивания аликвоту 10 мкл наносили на предметное стекло и анализировали под микроскопом. Изображения, полученные с помощью оптической и флуоресцентной микроскопии, представлены на Рисунке 2в и 2г соответственно. На изображении, полученном в оптическом канале видны отдельные частицы, соответствующие МПБ. Из-за своего размера и малой оптической плотности липосомы не могли быть обнаружены в оптическом микроскопе. На снимке этой же области в флуоресцентном режиме микроскопа видно наличие синего цвета на всей поверхности БСЛМ, отражающее присутствие меченных ДОФЕ-пирен объектов, т.е. комплексов КМЦД/липосомы, адсорбированных на МПБ. На следующем этапе была оценена способность молекул КМЦД с включенными гидрофобными соединениями взаимодействовать с катионными липосомами. Для этого сначала были исследованы ёмкости КМЦД по отношению к ряду гидрофобных соединений. В качестве

таких были выбраны: модельный фенолфталеин, биологически активные добавки- куркумин и фолиевая кислота, а также антибиотик- паклитаксел. Эксперимент проводился по методике, использованной ранее для анализа включения фенолфталеина в различные производные бета-циклодекстрина (Colloid J. 2006, 68,98-105): готовили серию растворов с различной концентрацией КМЦД к которым добавляли раствор гидрофобного соединения в ТГФ и регистрировали спектр поглощения в УФ и видимой области с помощью спектрофотометра. Концентрацию гидрофобных молекул поддерживали равной 0.00005 М. Для экспериментов использовали кюветы с длиной оптического пути 0.5 см. В области составов, при которых концентрация КМЦД обеспечивала растворимость гидрофобных соединений за счёт формирования комплексов по принципу хозяин-гость спектры поглощения не отличались друг от друга (см. типичные репрезентативные спектры на Рисунке 3). Реализация принципа взаимодействия хозяин-гость обеспечивается за счёт наличия у выбранных органических молекул ароматических фрагментов, которые геометрически соответствуют внутренней гидрофобной полости КМЦД. Однако, при превышении оптимального мольного состава смеси гидрофобная молекула/ КМЦД интенсивность адсорбции резко увеличивается, а также появляется сигнал, соответствующий мутности в области длин волн, для которых ранее раствор был оптически прозрачным. Было установлено, что для фенолфталеина, фолиевой кислоты и паклитаксела формируются комплексы мольного состава 1:1, в то время как для куркумина требуется 2 молекулы КМЦД, чтобы обеспечить его растворимость. Полученные данные хорошо согласуются с результатами, представленными в литературе для обычных бета-циклодекстринов, не содержащих карбоксильные группы. Полученные комплексы гидрофобная молекула/КМЦД были проанализированы методом ИК-спектроскопии. Для всех комплексов в спектрах были обнаружены характеристические полосы, соответствующие функциональным группам соответствующих органических молекул и КМЦД. Исследование взаимодействия комплексов КМЦД с включёнными гидрофобными соединениями было осуществлено с помощью комбинации метода лазерного микроэлектрофореза и динамического светорассеяния. Особый интерес представляло изучение адсорбции на катионные липосомы комплекса куркумин/КМЦД, поскольку он представляет собой две молекулы КМЦД, связанные остовом из куркумина. Было установлено, что профили кривой зависимости ЭФП липосом от количества добавленного КМЦД совпадают для пустого КМЦД и для комплексов гидрофобное вещество/КМЦД. Агрегации в системе также не наблюдалось вплоть до концентрации КМЦД 1.5 мг/мл. Таким образом, включение органических молекул во внутреннюю полость КМЦД не меняет характер адсорбции олигосахарида на поверхность ДОТАП/ДОФХ липосом. Стоит отметить, что полученные таким образом тройные системы гидрофобное соединение/КМЦД/липосома по количеству органических молекул, приходящихся на один липида практически на порядок превышают ёмкость индивидуальных липосомальных наноконтейнеров, описанных в литературе, для которых включение гидрофобных молекул осуществляется в область жирных хвостов липидного бислоя. Устойчивость комплексов к диссоциации в водно-солевых средах определяли комплексным методом, включающим регистрацию размера и ЭФП комплексов КМЦД/липосомы при различных ионных силах. Исходные комплексы различного состава были приготовлены в. Было установлено, что да-

же при концентрации NaCl 0.45 М - трёхкратно превышающей физиологическую ионную силу, в системе комплексов не наблюдалось фазового расслоения. Поскольку в высоких ионных силах определение ЭФП ограничено пределом работы электрода, взаимодействие катионных липосом и КМЦД регистрировали при максимальном значении ионной силы, соответствующей физиологической концентрации NaCl 0.15 М. На зависимости ЭФП комплексов от концентрации добавленных КМЦД наблюдалось уменьшение ЭФП так же, как и в случае для «безсолевого» буфера. Однако, по модулю сами значения были ниже, поскольку дзета потенциал коллоидных частиц значительно уменьшается при повышении ионной силы. Таким образом, при физиологических условиях комплексы КМЦД/липосомы сохраняются. Эксперименты по формированию комплексов КМЦД с ДОТАП/ДОФХ липосомами с $v = 0.3$ проводили для липосом, размер которых варьировался от 60 до 180 нм. Было установлено, что для липосом размером 130 и 180 нм профиль зависимости ЭФП от концентрации добавленных КМЦД практически не отличался. Уменьшение размера липосом до 90 нм приводило к уменьшению ЭФП исходных липосом до $+3.3$ (мкМ/с)/(В/см). При этом характер зависимости ЭФП от концентрации добавленных КМЦД не изменился - с ростом доли олигосахарида в системе ЭФП прогрессивно уменьшается, а затем выходит на плато. Уменьшение размера липосом до 60 нм сохраняет эту тенденцию. При этом стоит отметить, что максимальное количество молекул КМЦД, приходящееся на один липид, рассчитанное из кривых ЭФП по выходу зависимости на плато, сохраняется для всех исследованных размеров липосом. Далее были исследованы липосомы с промежуточным зарядом-доля ДОТАП в которых составляла $v = 0.15$. Методом лазерного микроэлектрофореза и динамического светорассеяния были исследованы липосомы со средним размером 90 нм. Было установлено, что, как и для липосом с долей ДОТАП $v = 0.3$, наблюдается эффективная адсорбция КМЦД на поверхность липосом. Комплекс КМЦД/липосомы ($v = 0.15$) также оказался устойчив к диссоциации на исходные КМЦД и липосомы при физиологической ионной силе. Примечательно, что количество молекул КМЦД, приходящихся на молекулу липида в насыщенном комплексе, составляло 2- т.е. практически совпадало с результатом, полученным для липосом с $v = 0.3$. Учитывая формирование ассоциатов КМЦД на поверхности липосом, возможно, определяющим фактором, ограничивающим число адсорбируемых молекул КМЦД, является геометрический, а не электростатический фактор. Данная гипотеза будет проверена в ходе работы по второму этапу проекта. Наконец, в 2022 году были начаты работы по исследованию цитотоксичности комплексов. Для этого был использован МТТ-тест, основанный на способности митохондриальных дегидрогеназ и эстераз конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий-бромид (МТТ) жёлтого цвета в пурпурный формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Формазан образуется только в живых клетках, и его количество позволяет рассчитать процент выживших клеток от их общего числа после добавления какого-либо реагента. Накануне эксперимента клетки карциномы молочной железы MCF-7/R высевали на планшет с плотностью 3.800 клеток на лунку. К клеткам добавляли тестируемый образец - раствор липосом, КМЦД, и комплексов КМЦД с биологически активными гидрофобными молекулами. Затем 50 мкл стерильного 1 мг/мл раствора МТТ в модифицированной культурной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium). План-

шет помещали во влажную 5% CO₂ атмосферу на три часа, затем среду извлекали, кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО и измеряли поглощение раствора при длине волны 550 нм. В качестве количественной меры цитотоксичности использовали значение концентрации добавленного вещества, при которой наблюдается гибель 50% клеток (LC50). Более высокое значение LC50 означало меньшую цитотоксичность образца. Для ДО-ТАП/ДОФХ липосом ($v = 0.3$) не наблюдалось цитотоксического действия на клетки вплоть до максимальной исследованной концентрации липосом 2 мг/мл. А для КМЦД не наблюдалось токсичности вплоть до максимальной исследованной концентрации 5 мг/мл. Для комплексов КМЦД/липосомы с долей КМЦД 0.25 от состава насыщенного комплекса цитотоксичности не наблюдалось также вплоть до максимальной исследованной концентрации по липосомам 2 мг/мл. Таким образом исходные компоненты для формирования липосомального наноконтейнера и сам комплекс КМЦД/липосомы не является токсичным и может быть использован для доставки биологически активных веществ. Далее была исследована цитотоксичность комплексов, содержавших антибиотик паклитаксел. Для этого были приготовлены комплексы КМЦД/паклитаксел, а затем сформирован тройной комплекс паклитаксел/КМЦД/липосомы. Было установлено, что концентрация паклитаксела в комплексе, вызывающая гибель 50% клеток составила приблизительно 10 мкг/мл. Чтобы оценить эффективность исследуемого нами наноконтейнера на основе катионных липосом с адсорбированными молекулами КМЦД было проведено сравнение с цитотоксичностью паклитаксела в коммерческом препарате фирмы Тева (Израиль) и специально синтезированных нами катионных полилактидных мицелл- объекта удобного для сравнения, как обладающего положительным зарядом поверхности и близким по значению средним размером. Для коммерческого образца LC50 паклитаксела составила 50 мкг/мл, а для мицеллярной формы LC 50 составила 40 мкг/мл. Таким образом, исследуемая нами система продемонстрировала высокую активность включённого антибиотика. Исследование цитотоксичности будет также продолжено на следующем этапе выполнения проекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были получены серии липосом из смеси электронейтрального и положительно заряженного липида (доля катионного липида варьировалась от 0 до 30 мол.%) с заданным размером в интервале 50-150 нм методом экструзии. Были сформированы молекулярные ансамбли ЦД на катионных липосомах и проведена оценка их коллоидной стабильности, размера и поверхностного заряда методами динамического светорассеяния и лазерного микроэлектрофореза. Установлено, что молекул ЦД, приходящихся на один катионный липид составляет от 2 до 5 штук. Установлено, что комплексы ЦД с липосомами устойчивы в физиологических ионных силах. Определена ёмкость сформированных наноконтейнеров по гидрофобному куркумину - она превышает в 10 раз количество куркумина, инкапсулируемое в традиционные липосомы.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
Объем финансирования темы в 2022 году
Таблица А.1

Источник финанси- рования	Объем (руб.)	
	Получено	Освоено собственными силами
грант РНФ	1 500 000,0	1 500 000,0