

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИПОСОМ, ЗАГРУЖЕННЫХ ТЕТРАКИС(4-БЕНЗИЛОКСИФЕНИЛ)ТЕТРАЦИАНОПОРФИРАЗИНОМ

Дьякова Д.В.¹, Лермонтова С.А.^{1,2}, Клапшина Л.Г.², Юдинцев А.В.¹, Балалаева И.В.¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: daryadyakova@mail.ru

²Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН

ул. Тropicина, 49, г. Нижний Новгород, 603137, РФ

Поступила в редакцию: 18.07.2018.

Аннотация. Фотосенсибилизаторы из группы тетра(арил)тетрацианопорфиразинов являются перспективными красителями для фотодинамической терапии опухолей и имеют уникальные свойства. Однако, применение таких фотосенсибилизаторов (ФС) *in vivo* требует использования специальных переносчиков, обеспечивающих эффективную доставку и селективное накопление препаратов в области злокачественного новообразования. Данное исследование направлено на изучение стабильности липосом различного состава при условии их загрузки фотосенсибилизатором тетракис(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразином (Pz). Показано, что исследуемый фотосенсибилизатор с эффективностью до 33 % может загружаться в нейтральные и отрицательно заряженные липосомы, состоящие из смеси фосфатидилхолина с холестерином и фосфатидилглицеролом, соответственно, без существенного влияния на их размер. Модификация поверхности липосом путем добавления гидрофильного полимера полиэтиленгликоля (в составе фосфатидилэтаноламин-N-[карбокси(полиэтилен гликоля)-2000]) приводит к увеличению эффективности загрузки фотосенсибилизатора в 2,2-2,5 раза (до 80 %). При этом размер липосом с покрытием полиэтиленгликолем при загрузке ФС увеличивается вдвое по сравнению с везикулами без Pz, что свидетельствует об их агрегации. Высокая эффективность загрузки Pz в липосомы дает предпосылки для дальнейшего создания липосомальной формы фотосенсибилизаторов данного класса при условии изменения способа поверхностного экранирования.

Ключевые слова: порфиразин, липосомы, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительный прогресс в лечении злокачественных новообразований существует большая потребность в разработке новых подходов к высокочувствительной диагностике и эффективной терапии. Одним из наиболее перспективных современных методов лечения онкологических заболеваний является фотодинамическая терапия (ФДТ). Этот метод основан на селективном накоплении фотосенсибилизатора (ФС) в опухолевой ткани. При воздействии света ФС генерирует активные формы кислорода, которые вызывают гибель опухолевых клеток [1].

В качестве ФС в ФДТ используются соединения из разных классов химических веществ, включая порфирины, хлорины и бактериохлорины, порфиразины, фталоцианины и нафталоцианины, нететрапиррольные фотоактивные красители [2]. В настоящее время разработка новых фотосенсибилизаторов преимущественно направлена на увеличение фотодинамической активности ФС, улучшение их фармакокинетики (для снижения фототоксичности и системных побочных эффектов) [3].

В работах [4, 5] нами были продемонстрированы преимущества применения новой группы красителей, принадлежащих к тетра(арил)тетрацианопорфиразинам. Данные красители проявляют высокую фотодинамическую активность, при этом время жизни возбужденного состояния порфиразинов и интенсивность флуоресценции зависят от вязкости среды [4]. Чувствительность порфиразинов к изменению вязкости окружения обусловлена свето-индуцированным вращением фрагментов их молекул. В средах с низкой вязкостью часть поглощенной световой энергии расходуется на внутримолекулярную подвижность. В результате этого процесса интенсивность флуоресценции данных соединений уменьшается. При переходе тетра(арил)тетрацианопорфиразинов в менее вязкое окружение, наоборот, интенсивность флуоресценции и время жизни их возбужденного состояния увеличивается [6]. Принимая во внимание тот факт, что процесс ФДТ сопровождается увеличением внутриклеточной вязкости, указанные фотофизические свойства тетра(арил)тетрацианопорфиразинов открывают большие перспективы для их двойного использования в качестве фотосенсибилизаторов и сенсоров внутриклеточной вязкости в процессе ФДТ (для мониторинга физиологического состояния клеток) [7].

Учитывая, что при системном введении данные вещества могут не только накапливаться в опухоли, но и распределяться по всему организму, для высокоэффективного применения ФС *in vivo* необходимо использовать специальные системы адресной доставки к пораженной области [8]. Направленная доставка противоопухолевых лекарственных средств позволяет минимизировать побочные эффекты [9]. Среди известных на сегодняшний день систем направленной доставки лекарств наиболее перспективными являются липосомы. Об этом свидетельствует широкий спектр их использования в клинике для доставки противогрибковых, противовоспалительных, и противоопухолевых препаратов [10]. В частности, большое внимание уделяется разработке липосомальных форм препаратов для ФДТ [11].

Следует отметить, что к стабильности систем доставки лекарственных средств предъявляются высокие требования: они должны иметь небольшой размер и не должны быть склонными к агрегации. Системы для направленной доставки лекарств должны обеспечивать пролонгированную циркуляцию лекарства в крови. При этом время выхода (высвобождения) препарата из носителя должно быть настолько большим, чтобы обеспечить эффективное накопление в пораженной области. Считается, что основными факторами, определяющими долговременную физико-химическую стабильность липосом, являются размер, дзета-потенциал, липидный состав и эффективность инкапсуляции [12].

Наряду с физико-химической стабильностью, важное значение для применения в клинике имеет биологическая стабильность, один из аспектов которой заключается в достаточно большом времени циркуляции в кровотоке. Увеличению биологической стабильности содействует покрытие поверхности липосом гидрофильными полимерами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливинил пирролидон или поли[N-(2-гидроксипропил)метакриламид [13]. Этот процесс носит название стерической стабилизации, которая предотвращает опсонизацию и дальнейшее выведение чужеродных для организма наночастиц из кровяного русла и организма в целом.

Ранее нами было показано, что липосомы, состоящие из фосфатидилхолина (ФХ) и его смесей с холестерином (Хол) и фосфатидилглицеролом (ФГ), имеют достаточно высокую долговременную физико-химическую стабильность и могут быть использованы для доставки в опухолевые клетки ФС из группы тетра(арил)тетрацианопорфиразинов [14]. В данной работе нами были получены липосомы различного состава. Для осуществления стерической стабилизации поверхность везикул была модифицирована путем добавления фосфолипида, конъюгированного с гидрофильным полимером (ПЭГ). Проведено исследование стабильности липосом различного состава при условии их загрузки фотосенсибилизатором тетракис(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразином. Показано, что исследуемый фотосенсибилизатор может быть загружен в липидные везикулы, при этом эффективность загрузки ФС зависит от липидного состава.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили однослойные липосомы, состоящие из яичного L- α -фосфатидилхолина (ФХ), холестерина (Хол), яичного L- α -фосфатидилглицерола (ФГ) и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[карбоксии(полиэтилен гликоля)-2000] (далее ДСФЭ-ПЭГ). Все липиды были произведены Avanti Polar Lipids, Inc. (USA).

Фотосенсибилизатор.

В работе использован фотосенсибилизатор из группы тетра(арил)тетрацианопорфиразинов - тетракис(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразин (Pz), представленный на рисунке 1. Данное соединение было синтезировано с использованием оригинального подхода подробно описанного в предыдущих работах [15, 16].

Получение липосом и загрузка фотосенсибилизатора.

Липосомы, состоящие из смесей ФХ с Хол (ФХ:Хол, 3:2), ФГ (ФХ:Хол:ФГ, 6:3:1), ФХ с Хол и ДСФЭ-ПЭГ (ФХ:Хол: ДСФЭ-ПЭГ, 11:8:1), ФГ (ФХ:Хол:ФГ:ДСФЭ-ПЭГ, 11:6:2:1) были получены с использованием метода экструзии с использованием поликарбонатных мембран с диаметром пор 100 нм.

Для загрузки Pz, к суспензии готовых липосом добавляли водный раствор ФС, приготовленный в фосфатном буферном растворе (PBS, pH 7,4), и инкубировали в течение 30-60 минут при комнатной температуре. Неинкапсулированный фотосенсибилизатор отделяли гель-фильтрацией с использованием колонки Sephadex G25, предварительно уравновешенной PBS.

Концентрацию загруженного в липосомы Pz в пробе после гель-фильтрации определяли по поглощению. Регистрация спектров поглощения Pz проводилась относительно PBS в диапазоне длин волн 200-800 нм с использованием спектрофотометра СФ 2000 (ЛОМО, Россия). Предварительно был экспериментально определен

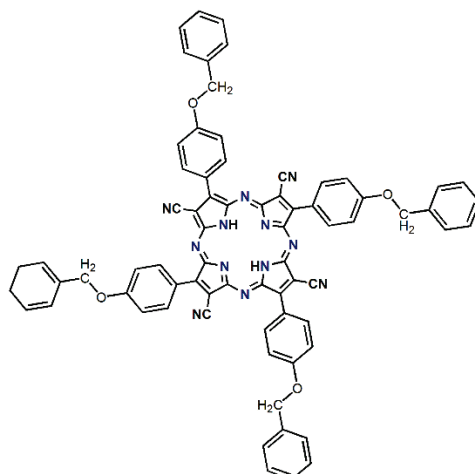


Рисунок 1. Структурная формула тетракис(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразина

молярный коэффициент экстинкции данного ФС в PBS на длине волны 595 нм, который составил $2,54 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Для оценки эффективности загрузки исследуемого фотосенсибилизатора в липосомы были рассчитаны эффективность связывания с липидным бислоем (EE, от англ. Encapsulation Efficiency, показывает, какая доля от общего количества добавленного к липосомам красителя загружена в липосомы) и эффективность загрузки липосом (LE, от англ. Loading Efficiency, характеризует эффективность применения липосом для доставки данного вещества), которые рассчитывались как:

$$EE = \frac{C_B}{C_T} 100\% \quad (1)$$

и

$$LE = \frac{C_B}{L}, \quad (2)$$

где L – концентрация липида в липосомах; C_T – общая концентрация добавленного препарата, C_B – концентрация связанного с липосомами ФС.

Характеристика размера и дзета-потенциала липосом.

Гидродинамический диаметр, индекс полидисперсности и дзета-потенциал липосом до и после загрузки порфиразина в липосомы измеряли в разбавленной липосомальной суспензии (липосомы разводились фосфатным буферным раствором, PBS (pH 7,4), в соотношении 1:10) с использованием методов динамического рассеяния света и электрофоретического рассеяния света на приборе Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcs., UK). Все эксперименты проводились при 25 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Загрузка ФС в липосомы.

В данной работе были получены однослойные липосомы, состоящие из смесей ФХ с Хол (ФХ:Хол, 3:2) и ФГ (ФХ:Хол:ФГ, 6:3:1). Стерическая стабилизация липосом достигалась путем модификации поверхности гидрофильным полимером - полиэтиленгликолем. Для этого в смесь липидов перед приготовлением липосом добавили фосфолипид, конъюгированный с ПЭГ (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[карбокси(полиэтилен гликоль)-2000]). Количество добавляемого модифицированного полимером липида составляло 5 мол. % от общего количества всех липидов, при этом соотношение содержания различных липидов было равно 11:8:1 в ФХ:Хол:ДСФЭ-ПЭГ липосомах, и 11:6:2:1 в ФХ:Хол:ФГ:ДСФЭ-ПЭГ везикулах.

Выбранное соотношение между количеством липидов и ПЭГ считается наиболее оптимальным для достижения стерической стабилизации, поскольку применение липосом, в состав которых входит около 5 мол.% липида с ПЭГ приводит к максимальному снижению адсорбции белков плазмы крови на везикулах [13].

Загрузка липосом фотосенсибилизатором производилась пассивным способом. Для оценки эффективности загрузки исследуемого фотосенсибилизатора в липосомы были рассчитаны параметры EE, показывающий, какая доля от общего количества добавленного к липосомам красителя загружена в липосомы, и LE, характеризующий эффективность применения липосом для доставки данного вещества, соответственно. Полученные значения данных параметров приведены в таблице 1.

Обнаружено, что в липосомы с немодифицированной поверхностью загружено около 33 % от общего количества добавленного ФС. При этом добавление отрицательно-заряженного ФГ не оказывает влияния на значения параметров EE и LE. Аналогичные результаты были получены нами и ранее в работе [14]. При этом наиболее вероятной локализацией исследуемого ФС является поверхность липосом. Следует отметить, что доля Pz, связанного с липосомами (EE) и эффективность загрузки липосом (LE) увеличиваются более чем в 2 раза при добавлении липида с ПЭГ. Вероятно, длинные нити ПЭГ, находящиеся на поверхности липосом, сольбилизируют Pz, как это наблюдалось в полимерных щетках в работе [17].

Влияние загрузки Pz на размер липосом.

Для контроля возможного влияния ФС на агрегацию липосом в работе был определен гидродинамический диаметр липосом (рис. 2) и показатель полидисперсности (PDI) до и после загрузки Pz (табл. 2).

PDI отражает неравномерность распределения по размеру. Низкие значения PDI (0-0,1) показывают, что образец имеет узкое (равномерное) распределение по размеру. Если PDI находится в диапазоне 0,1-0,4 или более, образец считается полидисперсным с широким распределением по размеру.

Таблица 1. Эффективность загрузки исследуемого фотосенсибилизатора в липосомы

Липидный состав	ФХ:Хол	ФХ:Хол:ДСФЭ-ПЭГ	ФХ:Хол:ФГ	ФХ:Хол:ФГ:ДСФЭ-ПЭГ
EE, %	32	80,2	33	74,1
LE	0,51	1,58	0,53	1,37

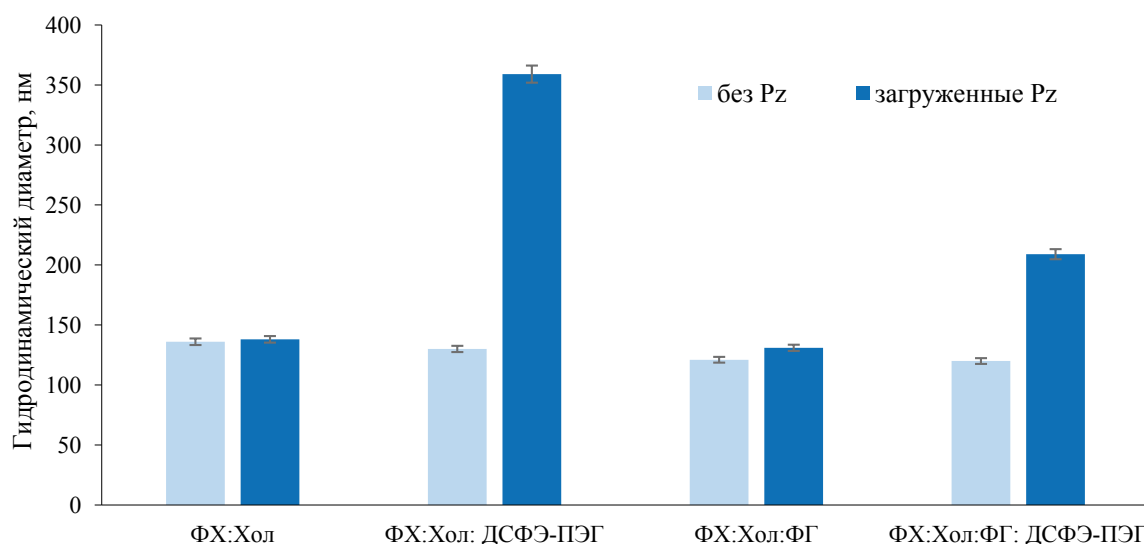


Рисунок 2. Влияние загрузки ФС на размер липосом в зависимости от липидного состава (планки погрешности отражают стандартное отклонение)

Обнаружено, что гидродинамический диаметр липосом с немодифицированной ПЭГ поверхностью составил 128 ± 8 нм (рис. 2). При загрузке фотосенсибилизатора размер менялся незначительно (в пределах 7%). Это свидетельствует о том, что загрузка порфиразина в липосомы не оказывает влияния на их размер. При этом индекс полидисперсности пустых и загруженных Pz липосом без ПЭГ принимает значения, соответствующие моодисперсным образцам (0,02-0,06).

Липосомы с ПЭГ-содержащим липидом до загрузки порфиразина имеют размер 120-130 нм, при этом полученные значения PDI примерно равны 0,1. Образцы с таким PDI считаются умеренно полидисперсными, то есть при добавлении ДСФЭ-ПЭГ часть липосом увеличивается в размерах. Это обусловлено тем, что при содержании ПЭГ меньше 5% полимер, покрывая наночастицы «обволакивает» их принимая грибовидную (mushroom) форму, а при концентрации большей 5% – принимает конформацию типа «щетки» (brush) [18]. Таким образом, при 5% содержании ПЭГ размер липосом может немного варьироваться, что и наблюдалось в эксперименте. При загрузке Pz в липосомы, содержащие в составе ДСФЭ-ПЭГ, наблюдалось увеличение размера и индекса полидисперсности в два и более раза (рис. 2, табл. 2). Наблюдаемые высокие значения индекса полидисперсности (0,4-0,5) свидетельствуют о тенденции таких липосом к агрегации.

Дзета-потенциал липосом, загруженных Pz.

Для контроля склонности липосом к агрегации было проведено измерение дзета-потенциала везикул. Дзета-потенциал представляет собой электрокинетический потенциал, возникающий при движении частиц между адсорбционным слоем ионов, располагающимся на поверхности частиц, и диффузионным слоем ионов среды, окружающим частицу. Величина дзета-потенциала позволяет оценить степень отталкивания частиц друг от друга.

Обнаружено, что связывание порфиразина с ФХ:Хол:ФГ липосомами сопровождалось статистически значимым увеличением (на 50%) отрицательного значения дзета-потенциала (табл. 3).

В липосомах, содержащих в своём составе ДСФЭ-ПЭГ значение дзета-потенциала было меньше, чем в липосомах иного липидного состава. Это может быть связано с тем, что длинные гидрофильные цепи ДСПЭ-ПЭГ служат экраном для внешней поверхности липосом и уменьшают абсолютное значение дзета-потенциала [19].

Максимальное по модулю значение дзета-потенциала (-27 мВ) наблюдалось в ФХ:Хол:ФГ липосомах, загруженных Pz. Данные результаты хорошо согласуются с результатами, опубликованными ранее [14]. Известно, что частицы с дзета-потенциалом менее ± 25 мВ обладают склонностью к агрегации. Таким образом, от липосом ФХ:Хол:ФГ можно ожидать наибольшую стабильность. Значения дзета-потенциала у остальных образцов говорят о том, что липосомы способны к агрегации и коллоидная система не устойчива.

Таблица 2. Влияние загрузки порфиразина на индекс полидисперсности липосом

Образец	PDI	
	без Pz	+ Pz
ФХ:Хол	0.054	0.039
ФХ:Хол:ФГ	0.058	0.024
ФХ:Хол:ДСФЭ-ПЭГ	0.110	0.507
ФХ:Хол:ФГ:ДСФЭ-ПЭГ	0.117	0.469

Таблица 3. Влияние загрузки порфиразина на дзета-потенциал липосом

Образец	Дзета-потенциал, мВ	
	без Pz	загруженные Pz
ФХ:Хол	-13 ± 1,6	-18 ± 1,0
ФХ:Хол:ДСФЭ-ПЭГ	-10 ± 1,2	-13 ± 1,1
ФХ:Хол:ФГ	-18 ± 0,7	-27 ± 1,8*
ФХ:Хол:ФГ:ДСФЭ-ПЭГ	-12 ± 0,2	-13 ± 2,1

* – статистически значимое отличие от липосом без Pz (p<0.05, критерий Стьюдента)

Добавление ПЭГ в липосомы уменьшало абсолютное значение дзета-потенциала. Это явление можно объяснить тем, что ПЭГ представляет собой гидрофильный слой, образованный вокруг липосомных мембран, который отодвигает плоскость скольжения двойного электрического слоя от поверхности липосом, что приводит к уменьшению абсолютной величины дзета-потенциала [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование влияния состава липосом на эффективность их загрузки фотосенсибилизатором тетраакис(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразином и физико-химические свойства (размер, дзета-потенциал), характеризующие стабильность везикул. Показано, что исследуемый фотосенсибилизатор с относительно высокой эффективностью (до 33%) может загружаться в нейтральные и отрицательно заряженные липосомы, состоящие из смеси фосфатидилхолина с холестерином и фосфатидилглицеролом, при этом не оказывая существенного влияния на их размер. Модификация поверхности липосом путем добавления ДСФЭ-ПЭГ приводит к увеличению эффективности загрузки фотосенсибилизатора до 80 %. Однако, такие липосомы при загрузке ФС становятся склонными к агрегации.

Высокая эффективность загрузки Pz в липосомы дает предпосылки для дальнейшего создания липосомальной формы фотосенсибилизаторов данного класса при условии изменения способа поверхностного экранирования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 16-34-60117 в части химического синтеза и проект № 18-44-520010 в части исследования свойств полученных липосом), а также Госзадания Минобрнауки России (персональная поддержка научных сотрудников, проект № 6.7083.2017/9.10).

Список литературы / References:

1. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, vol. 61, pp. 250-881.
2. Hamblin M.R., Mroz P. History of PDT: The first hundred years. In: *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*, Norwood, MA: Artech House, Inc, 2008.
3. Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.*, 2016, vol. 473, pp. 347-364.
4. Lermontova S., Grigorev I., Shilyagina N., Peskova N., Balalaeva I., Shirmanova M., Klapshina L. New Porphyrazine Macrocycles with High Viscosity-Sensitive Fluorescence Parameters. *Russian Journal of General Chemistry*, 2016, vol. 86, no. 6, pp. 1011-1018.
5. Klapshina L.G., Douglas W.E., Grigoryev I.S., Ladilina E.Yu., Shirmanova M.V., Mysyagin S.A., Balalaeva I.V., Zagaynova E.V. Novel PEG-organized biocompatible fluorescent nanoparticles doped with an ytterbium cyanoporphyrazine complex for biophotonic applications. *Chem. Commun.*, 2010, no. 44, pp. 8398-8400.
6. Izquierdo M.A., Vyšniauskas A., Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Kuimova M.K. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers during photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, no. 3, pp. 1089-1096.
7. Kuimova M.K., Botchway S.W., Parker A.W., Balaz M., Collins H.A., Anderson H.L., Suhling K., Ogilby P.R. Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death. *Nat. Chem.*, 2009, vol. 1, pp. 69-73.
8. Obaid G., Broekgaarden M., Bulin A.L. Photonanomedicine: a convergence of photodynamic therapy and nanotechnology. *Nanoscale*, 2016, vol. 8, pp. 12471-12503.
9. Lytton-Jean A.K., Kauffman K.J., Kaczmarek J.C., Langer R. Cancer nanotherapeutics in clinical trials. *Cancer Treat. Res.*, 2015, vol. 166, pp. 293-322.
10. Lamichhane N., Udayakumar T.S., D'Souza W.D., Simone C.B., Raghavan S.R., Polf J., Mahmood J. Liposomes: clinical applications and potential for image-guided drug delivery. *Molecules*, 2018, vol. 23, p. 288.
11. Skupin-Mrugalska P., Piskorz J., Goslinski T., Mielcarek J., Konopka K., Düzgüneş N. Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers. *Drug Discov. Today*, 2013, vol. 18, pp. 776-784.

12. Uchiyama K., Nagayasu A., Yamagiwa Y., Nishida T., Harashima H., Kiwada H. Effects of the size and fluidity of liposomes on their accumulation in tumors: a presumption of their interaction with tumors. *Int. J. Pharm.*, 1995, vol. 121, no. 2, pp. 195-203.
13. Perche F., Torchilin V.P. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *Journal of Drug Delivery*, 2013.
14. Yudin'tsev A.V., Shilyagina N.Y., Dyakova D.V., Lermontova S.A., Klapshina L.G., Guryev E.L., Balalaeva I.V., Vodenev V.A. Liposomal form of tetra(aryl)tetracyanoporphyrzine: physical properties and photodynamic activity *in vitro*. *Journal of Fluorescence*, 2018, vol. 28, no. 2, pp. 513-522.
15. Klapshina L.G., Grigoryev I.S., Douglas W.E., Trifonov A.A., Gudilenkov I.D., Semenov V.V., Bushuk B.A., Bushuk S.B. Metal template assembly of highly functionalized octacyanoporphyrzine framework from TCNE structural units. *Chem. Commun.*, 2007, vol. 19, pp. 1942-1944.
16. Lermontova S.A., Grigor'ev I.S., Peskova N.N., Ladilina E.Y., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Boyarskii V.P. New promising porphyrzine-based agents for optical theranostics of cancer. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2017, vol. 87, pp. 479-484.
17. Yakimansky A.V., Meleshko T.K., Ilgach D.M., Bauman M.A., Anan'eva T.D., Klapshina L.G., Lermontova S.A., Balalaeva I.V., Douglas W.E. Novel regular polyimide- graft-poly(methacrylic acid) brushes: synthesis and possible applications as nanocontainers of cyanoporphyrzine agents for photodynamic therapy. *Journal of polymer science, part a: polymer chemistry*, 2013, vol. 51, pp. 4267-4281.
18. Lee H., Larson R.G. Adsorption of plasma proteins onto pegylated lipid bilayers: the effect of peg size and grafting density. *Biomacromolecules*, 2016, vol. 17, pp. 1757-1765.
19. Hood R.R. Microfluidic Synthesis of PEG- and Folate-Conjugated Liposomes for One-Step Formation of Targeted Stealth Nanocarriers. *Pharm. Res.*, 2013, vol. 30, no. 6, pp. 1597-1607.
20. Zhao W., Zhuang S., Qi X. Comparative study of the *in vitro* and *in vivo* characteristics of cationic and neutral liposomes. *Int. J. Nanomedicine*, 2011, vol. 6, pp. 3087-3098.

**STUDY OF STABILITY OF LIPOSOMES LOADED WITH
TETRAKIS(4-BENZYLOXYPHENYL)TETRACYANOPORPHYRAZINE**
Dyakova D.V.¹, Yudin'tsev A.V.¹, Lermontova S.A.^{1,2}, Klapshina L.G.², Balalaeva I.V.¹

¹ Lobachevsky University

Gagarin ave., 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

² G.A. Razuvaev Institute of Organometallic Chemistry of the RAS

Tropinin str., 49, Nizhny Novgorod, 603137, Russia; e-mail: daryadyakova@mail.ru

Abstract. Photosensitizers from the group of tetra(aryl)tetracyanoporphyrzines are the promising dyes for photodynamic therapy of tumors with unique properties. However, *in vivo* application of such photosensitizers (PS) requires the use of special drug carriers that ensure effective delivery and selective accumulation in the tumor site. The present study is focused on obtaining liposomes with different lipid composition loaded with tetrakis(4-benzyloxyphenyl)tetracyanoporphyrzine (Pz) and examining their stability. An efficient loading of the dye (with loading efficiency up to 33 %) was proved for the neutral and negatively charged liposomes composed of phosphatidylcholine with cholesterol and phosphatidylglycerol. It was found that porphyrzine do not affect the size of these vesicles. Surface modification of the liposomes by adding polyethylene glycol (in the composition of phosphatidylethanolamine-N-[carboxy (polyethylene glycol)-2000]) increases the loading efficiency of the photosensitizer by 2,2-2,5 times (up to 80 %). At the same time, the size of liposomes coated with polyethylene glycol is doubled after Pz loading compared to vesicles without Pz. This result indicates that Pz causes the aggregation of such liposomes. The high loading efficiency of Pz into liposomes gives the prerequisites for the further development of the liposomal form of photosensitizers of this class by means of optimization of the method of surface coating.

Key words: porphyrzine, liposomes, photodynamic therapy, photosensitizer.