

ПОКРЫТИЕ ЛИПОСОМ ХИТОЗАНОМ И ИХ МУКОАДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА**Горбач В.И., Ермак И.М., Давыдова В.Н.**

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
пр. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: vikdavidova@yandex.ru; vigorbach@bk.ru
Поступила в редакцию: 23.07.2019

Аннотация. Получены нейтральные (НЛ) и анионные липосомы (АЛ) покрытые хитозаном. Определены их размер и ζ -потенциал. НЛ представляли собой частицы с узким молекулярно-массовым распределением и средним диаметром $435,6 \pm 59,9$ нм. АЛ были более гетерогенными со средним диаметром $525,8 \pm 76,3$. Покрытие хитозаном способствовало перезарядке липосом. В случае НЛ было достаточно 100 мкг/мл хитозана, чтобы получить положительно заряженные частицы. АЛ покрытые хитозаном показывали изменение заряда, пропорционально концентрации добавленного полисахарида: при инкубации с раствором хитозана в концентрации 100 мкг/мл их заряд нейтрализовался только частично. Положительно заряженные липосомы были получены при инкубации с раствором хитозана с концентрацией 400 мкг/мл. Показано, что липосомы покрытые хитозаном проявляют мукоадгезивные свойства, прикрепляясь к слизистой поверхности ткани кишечника, причем этот процесс зависит от времени. После 5 мин инкубации к поверхности слизистой прикрепляется около 10% НЛ и АЛ. Увеличение времени инкубации до 60 мин количество адгезированных липосом возрастает. При этом активность НЛ была в 2 раза выше, чем АЛ.

Ключевые слова: липосомы, хитозан, ζ -потенциал, мукоадгезивные свойства.

Липосомы представляют собой бислойные искусственные частицы, образующиеся при механическом воздействии на дисперсию холестерина и фосфолипидов в водном растворе. Благодаря своим размерам и биосовместимости липосомы являются одним из перспективных способов доставки лекарственных препаратов. Включение активной субстанции в липосомальную матрицу защищает ее от преждевременного воздействия агрессивной среды ЖКТ и действия ферментов, наряду с этим облегчает проникновение в клетку.

Липосомы, получаемые путем механического воздействия на липидную пленку, представляют собой гетерогенную суспензию, поэтому к настоящему времени разработаны различные методы, позволяющие получать более однородные препараты. Для этого используют центрифугирование, хроматографию, а также пропускание суспензии липосом через мембраны с различными размерами пор на специальных приборах – экструдерах, что позволяет получать как очень мелкие липосомы, размерами 50-100 нм, так и частицы средних размеров порядка 200-500 нм. Липосомы такого размера достаточно легко выделяются на обычных лабораторных центрифугах и могут содержать в своем объеме разнообразные биологически активные соединения для адресной доставки к клеткам или органам человека. Нами проводятся исследования по включению в липосомы, разработанного в ТИБОХ ДВО РАН препарата «Гистохром®», получаемого из экстракта морских ежей, и его комплексов с полисахаридами красных водорослей для создания на их основе препаратов, которые могут быть использованы в кардиологии, офтальмологии, а также при заболеваниях желудочно-кишечного тракта [1].

Свойства липосом могут значительно варьировать в зависимости от липидного состава, поверхностного заряда, размера и способа приготовления. Часто в состав фосфолипидной смеси включают анионные или катионные гидрофобные соединения, например, дицетилфосфат (ДЦФ) или цетиламин, что позволяет получать отрицательно- или положительно-заряженные липосомы. Присутствие заряженных молекул приводит к увеличению общего объема водной фазы во внутреннем пространстве липосомы (в результате отталкивания соседних бислоев) и уменьшению вероятности агрегации липосом после их приготовления. Увеличенный объем внутренней фазы липосом в свою очередь позволяет увеличить дозу загружаемого лекарственного средства. Однако, катионные липосомы могут иметь цитолитическую и цитотоксическую активность. Так, например, катионные липосомы, содержащие стеариламин, были токсичными для кроликов, поскольку вызывали гемолиз эритроцитов [2]. В тоже время положительно заряженные липосомы проявляют большую способность к взаимодействию с клетками организма, что позволяет увеличить вероятность включения активной субстанции непосредственно в клетки [3].

Альтернативным способом получения положительно заряженных липосом служит их покрытие природными полимерами, в частности полисахаридом хитозаном. Хитозан представляет собой биосовместимый катионный полисахарид, состоящий из остатков 1,4-связанного D-глюкозамина, часть которого ацетилирована по аминогруппе. Этот полисахарид показывает хорошие мукоадгезивные свойства, обладая способностью удерживаться на слизистых оболочках различных тканей макроорганизма.

Целью данной работы было получение липосом различного состава (нейтральных и анионных), покрытие их хитозаном, определение физико-химических характеристик и сравнительная оценка мукоадгезивных свойств полученных липосом.

Нейтральные и анионные липосомы были получены при обработке ультразвуком липидной пленки, состоящей из яичного лецитина и холестерина (нейтральные липосомы (НЛ)) или лецитина, холестерина и ДЦФ

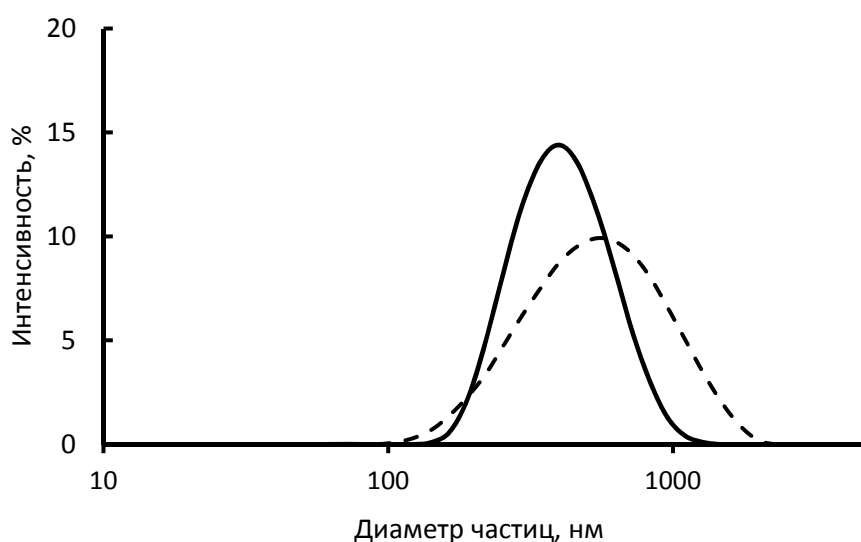


Рисунок 1. Распределение НЛ (сплошная линия) и АЛ (пунктирная линия) по размерам

(анионные липосомы (АЛ)). Для получения более гомогенных препаратов частицы были пропущены через экструдер с размером пор 0,4 мкм и охарактеризованы методом динамического рассеяния света (ДРС) (рис. 1). Как можно видеть из рисунка, НЛ представляли собой частицы с узким молекулярно-массовым распределением (индексом полидисперсности (ИП) – $0,153 \pm 0,042$) и средним диаметром $435,6 \pm 59,9$ нм. АЛ были более гетерогенными – их ИП составил $0,263 \pm 0,019$ со средним диаметром $525,8 \pm 76,3$.

Для покрытия липосом из панциря камчатского краба нами получен хитозан с помощью щелочной обработки. Согласно данным ^1H -ЯМР-спектроскопии полисахарид содержал около 4% N-ацетатных групп. Для получения положительно заряженных частиц НЛ и АЛ были инкубированы с раствором хитозана в концентрации 100 или 400 мкг/мл. Согласно данным ДРС, покрытие липосом хитозаном не оказывало значительного влияния на их размер, хотя ИП незначительно увеличивался.

Поверхностный заряд (ζ -потенциал) полученных липосом, представленный в таблице 1, зависел от количества нанесенного на них хитозана.

НЛ и АЛ в дистиллированной воде имели отрицательное значение поверхностного потенциала. Отрицательный заряд для липосом, содержащих в своем составе нейтральные фосфолипиды был зарегистрирован ранее в работах других исследователей [4]. Покрытие хитозаном приводило к перезарядке липосом. В случае НЛ было достаточно 100 мкг/мл хитозана, чтобы получить положительно заряженные частицы. При увеличении концентрации полисахарида до 400 мкг/мл заряд липосом также увеличивался и достигал $+43,9 \pm 1,2$ мВ.

Липосомы, содержащие ДЦФ, при покрытии хитозаном показывали изменение заряда, пропорционально концентрации добавленного полисахарида: при инкубации с раствором хитозана в концентрации 100 мкг/мл их заряд был нейтрализован только частично и становился равным – 19,5 мВ. Положительно заряженные липосомы были получены при инкубации с раствором хитозана с концентрацией 400 мкг/мл.

Одним из требований, предъявляемых к пероральным лекарственным формам является наличие у них мукоадгезивных свойств. Для сравнительной оценки мукоадгезивных свойств исходных и покрытых хитозаном липосом была использована свежемороженая слизистая ткань тонкого кишечника свиньи и липосомы, содержащие флуоресцентную метку – сульфородамина В натриевую соль. Для оценки способности липосом прикрепляться и удерживаться на слизистой оболочке суспензию наносили на поверхность слизистой ткани кишечника и инкубировали при 25°C в течение 1 часа, после чего ткань промывали и обрабатывали смесью вода/бутанол (1:1 об/об) центрифугировали и определяли флуоресценцию водного слоя.

Таблица 1. Значения ζ -потенциала липосом

| Образец | ζ -потенциал, mV |
|---------------------------------------|------------------------|
| Нейтральные липосомы | $-24,5 \pm 1,5$ |
| Нейтральные липосомы + ХН (100 мкг) | $+27,4 \pm 0,1$ |
| Нейтральные липосомы + ХН (400 мкг) | $+43,9 \pm 1,2$ |
| Отрицательные липосомы | $-26,5 \pm 1,1$ |
| Отрицательные липосомы + ХН (100 мкг) | $-19,5 \pm 0,8$ |
| Отрицательные липосомы + ХН (400 мкг) | $+20,1 \pm 0,4$ |

На основании полученных данных рассчитывали % липосом, прикрепившихся к поверхности слизистой ткани по формуле (1):

$$A = \frac{F_1}{F_0} 100\% \quad (1)$$

где A – % прикрепившихся липосом; F_0 – флуоресценция водного экстракта лизированной суспензии исходных липосом; F_1 – флуоресценция водного экстракта после инкубации с тканью.

Полученные данные представлены на рисунке 1.

Как можно видеть из рисунка 2 липосомы проявляют мукоадгезивные свойства, прикрепляясь к слизистой поверхности ткани кишечника, причем этот процесс зависит от времени. После 5 мин инкубации к поверхности слизистой прикрепляется около 10% НЛ и АЛ. Увеличение времени инкубации до 60 мин количество адгезированных липосом возрастает. При этом активность НЛ в 2 раза выше, чем АЛ. Как известно, гликопротеины или муцины – основные компоненты слизистых оболочек – при физиологических рН заряжены отрицательно, что вероятно препятствует связыванию АЛ со слизистой. Обработка обеих типов липосом хитозаном повышает их способность прикрепляться и удерживаться на поверхности слизистой ткани, что может быть связано с мукоадгезивными свойствами самого хитозана, который обладает выраженной способностью связываться со слизистыми оболочками различных тканей млекопитающих [5]

Мукоадгезивный эффект у анионных липосом, покрытых хитозаном почти в 1,5 раза выше, чем у нейтральных. Можно предположить, что в случае липосом, содержащих в своем составе ДЦФ, хитозан нанесенный на их поверхность удерживается более прочно за счет электростатических сил взаимодействия между аминогруппами поликатиона и фосфатными группами на поверхности липосом. Поскольку сам полисахарид обладает высокой способностью связываться мукусом, это может служить причиной высокой адгезии АЛ, покрытых хитозаном, к тканевой поверхности. В тоже время при нанесении хитозана на поверхность нейтральных липосом, полисахарид удерживается в основном за счет водородных связей, и может частично удаляться с их поверхности при инкубации с тканью кишечника. В результате чего, липосомы, лишённые хитозана удаляются со слизистой.

Таким образом, в результате покрытия НЛ и АЛ хитозаном получены положительно заряженные липосомы, характеризующиеся узким молекулярно-массовым распределением. Покрытие липосом полисахаридом изменяет их заряд и увеличивает способность взаимодействовать с тканями организма.

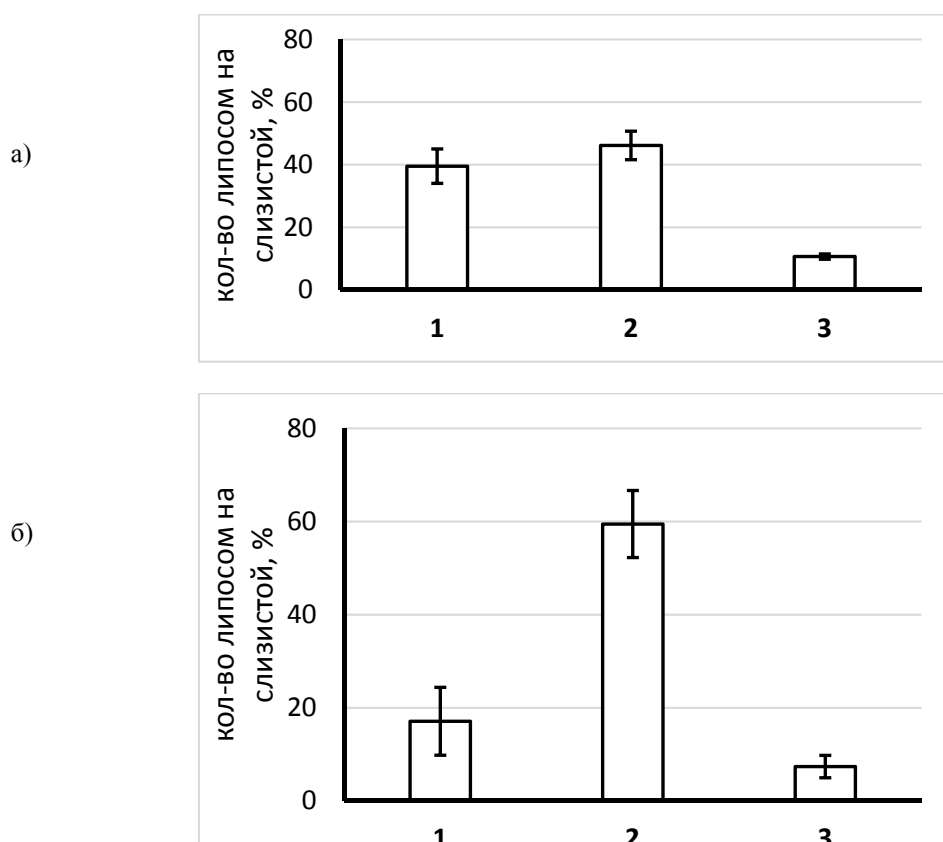


Рисунок 2. Количество нейтральных (а) и анионных (б) липосом, прикрепленных к поверхности муцинового слоя кишечника. 1 – исходные липосомы, инкубированные со слизистой 1 ч; 2 – липосомы, покрытые хитозаном, инкубированные со слизистой 1 ч; 3 – липосомы, покрытые хитозаном, инкубированные со слизистой 5 мин.

Экспериментальная часть.

Холестерин, дицетилфосфат, сульфородамин В натриевая соль (CP) получены из фирмы Sigma – Aldrich (USA).

Лецитин был получен из яичного желтка после осаждения ацетоном, экстракции и очистки препаративной колоночной хроматографией на окиси алюминия по методу [6].

Получение липосом. К 0,18 мл раствору лецитина (10%) добавляли 0,1 мл раствора холестерина (83,4 мг/1мл) для нейтральных липосом и дополнительно 0,1 мл ДЦФ (7,2 мг/мл) для кислых липосом в смеси хлороформ-метанол 9/1 об/об, упаривали на ротормном испарителе и далее сушили в вакууме ротормного насоса 3 часа. Готовили универсальный физиологический буфер – NaOAc x 3 H₂O, MES, HERES, Tris, глицин, 0,1 M NaCl с pH 6.0. К полученным липидным пленкам добавляли 0,5 мл раствора CP (2 мг/мл) разведенного в 10 раз с буфером. Смесь озвучивали на ультразвуковой бане (37 Кгц) 5 минут, отмывали от невключенного в липосомы красителя центрифугированием 3 раза с 2 мл буфера 20 мин при 15000 g. Осадок липосом суспендировали в 3,0 мл буфера, пропускали на экструдере порциями по 1 мл через мембрану 0,4 мкм 10 раз. К половине суспензии добавляли 0,3 мл воды, к другой 0,3 мл раствора хитозана в буфере (0,2 мг/мл или 0,4 мг/мл), выдерживали в темноте 1,5 часа, разбавляли буфером до 4 мл.

Размеры липосом, индекс их полидисперсности и значения ζ -потенциала были определены с использованием ZetaSizer NanoZS (Malvern, UK) при 633 нм [1].

Для изучения адгезивных свойств липосом свежемороженную ткань тонкого кишечника свиньи размораживали при комнатной температуре в ФБР (pH 7,2), навеску ткани массой около 0,5 г помещали в чашки Петри (d = 40 мм), наливали сверху 0,4 мл суспензии липосом, выдерживали 1 час в темноте, сливали суспензию. Оставшуюся ткань промывали 5 раз водой, подсушивали фильтровальной бумагой, измельчали, переносили в пробирки объемом 1,5 мл. Добавляли 0,4 мл воды и 0,4 мл н-бутанола, обрабатывали ультразвуком 20 мин для разрушения адгезированных липосом, измеряли количество выделившегося CP в водной фазе на спектрофлуориметре (Microplate Fluorescence Reader, FL-600, BIO-ТЕК Instrument, inc) в микропланшетах на 200 мкл в сравнении с общим количеством вносимого в эксперимент CP в липосомах при поглощении λ_{exc} 530 нм и испускании λ_{em} 590 нм.

Список литературы / References:

1. Yermak I.M., Gorbach V.I., Glazunov V.P., Kravchenko A.O., Mishchenko N.P., Pimenova E.A., Davydova V.N. Liposomal form of the echinochrome-carrageenan complex. *Marine Drugs*, 2018, vol. 16, no. 9, p. 324. DOI: 10.3390/md16090324
2. Turanskaya S.P., Turov V.V., Gorbyk P.P. Preparation of liposomes for targeted drug delivery/ *Surface*, 2009, no. 15, pp. 189-214. DOI: 10.15407/Surface
3. Liu D., Song Y.K. Cationic liposome--mediated transfection *in vivo* (review). *Gene Therapy and Molecular Biology*, 1998, vol. 2, pp. 59-68
4. Li N., Zhuang C., Wang M., Sun X., Nie S., Pan W. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, vol. 379, no. 1, pp. 131-138, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.06.020
5. Sogias I.A., Williams A.C., Khutoryanskiy V.V. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 2008, vol. 9, no. 7, pp. 1837-1842. DOI: 10.1021/bm800276d
6. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г. *Препаративная биохимия липидов*. М.: Наука, 1981, 259 с. [Bergelson L.D., Dyatlovitskaya E.V., Molotkovsky Yu.G. *Preparative biochemistry of lipids*. М.: Science, 1981, 259 p. (In Russ.)]

COATING LIPOSOMS WITH CHITOSAN AND THEIR MUCOADHESIVE PROPERTIES**Gorbach V.I., Yermak I.M., Davydova V.N.**

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS

pr. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: vikdavidova@yandex.ru; vigorbach@bk.ru

Abstract. Neutral (NL) and anionic liposomes (AL) coated with chitosan were prepared. Their size distribution and ζ -potential were determined. NL were particles with a narrow molecular weight distribution and an average diameter of 435.6 nm. AL were more heterogeneous with an average diameter of 525.8 nm. Chitosan coating led to liposome recharging. In the case of NL, 100 μ g / ml of chitosan was sufficient to obtain positively charged particles. AL coated with chitosan showed a change in charge depending on the concentration of the added polysaccharide. Incubation of liposomes with a chitosan solution at a concentration of 100 μ g/ml neutralized their charge only partially. Positively charged liposomes were obtained by incubation with chitosan solution at a concentration of 400 μ g/ml. It has been shown that liposomes coated with chitosan exhibit mucoadhesive properties, attaching to the mucosal surface of the intestinal tissue, and this process depends on time. After 5 minutes of incubation, about 10% NL and AL were attached to the mucosal surface. Increasing the incubation time to 60 minutes raised the amount of adhered liposomes. At the same time, the activity of NL was 2 times higher than that of AL.

Key words: liposomes, chitosan, ζ -potential, mucoadhesive properties.