

Р. Г. Редькін¹, Н. Ф. Орловецька², О. С. Данькевич²¹ Науково-дослідний центр PRO.MED.CS Praha a.s., Чеська Республіка² Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України

Приготування ліпосом із фосфоліпідами та дослідження їх фотовзаємодії із флуорофор-місткою сполукою

Мета роботи – обґрунтувати оптимальну технологію отримання двох видів біоспоріднених ліпосом на основі композиції дипальмітоїл-L- α -фосфатидилхолін (DPPC) або пальмітоїлсфінгомієлін-N-гесадеканоїл-D-еритросфінгосилфосфорилхолін (C₁₆-SM) із холестеролом та дослідження їх фотовзаємодії із флуорофор-місткою сполукою.

Матеріали та методи. Для приготування ліпосомальних везикул на основі фосфоліпідів – DPPC, C₁₆-SM та холестеролу (1:1) було використано метод зворотнофазового випаровування на ротаційному вакуумному випарувачі Büchi-210. Гомогенізацію ультразвуком проводили за допомогою сонікатора Jeken (Codyson) PS-08A. Флуоресцентну сполуку R-203 (5'-ізопропіл-3'-((4-метил-2-оксо-2H-хромен-7-іл)-карбамоїл)-2-оксоспіро-[індолін-3,2'-піролідін]-4'-карбонову кислоту) із 7-амінокумариновим (7-AMК) флуорофором отримували шляхом раніше описаної синтезу. Визначення розміру частинок ліпосом здійснювали за допомогою лазерної дифракції на приладі LA-960 Laser Particle Size Analyzer (Horiba Scientific). Діапазон вимірювання приладу складає від 0,01 мкм до 5000 мкм; гарантована точність $\pm 0,6$ %. Реєстрацію спектрів флуоресценції проводили в діапазоні емісії 365...650 нм на спектрофлуориметрі FluoroMax[®]-4 (Horiba Scientific) за довжини збуджувальної хвилі 350 нм. Спектри флуоресценції R-203 ($\lambda_{em} = 412$ нм) вимірювали в кюветі об'ємом 500 мкл.

Результати та їх обговорення. Цільові ліпосоми було отримано на базі композиції DPPC або C₁₆-SM із холестеролом у співвідношенні фосфоліпідів та холестеролу 1:1. Оптимального розміру ліпосом близько 100 нм вдалося досягти для складу C₁₆-SM : холестерол (1:1). Розрахований параметр пакування (γ) дозволив зробити висновок, що у випадку фосфоліпідів DPPC та C₁₆-SM параметр $\gamma < 1$, тобто молекули цих ліпідів мають форму конуса та упаковуються у фазу I типу, де молекули можуть утворювати сферичні (везикули) та/або циліндричні міцели. Однак фосфоліпід C₁₆-SM має більшу полярну площу молекули (a_0), на відміну від молекули DPPC. Досліджено спектри флуоресценції за взаємодії R-203 із ліпосомами DPPC : холестерол та C₁₆-SM : холестерол (1:1) у фосфатно-сольовому буфері з рН 7,4. За взаємодії флуоресцентної речовини R-203 спостерігали гасіння інтенсивності флуоресценції згідно з рівнянням Штерна-Фольмера, більш інтенсивно для ліпосом C₁₆-SM : холестерол, ніж у випадку ліпосом DPPC : холестерол.

Висновки. Запропоновано оптимальну технологію отримання двох видів біоспоріднених ліпосом на базі композиції DPPC або C₁₆-SM із холестеролом (1:1) на основі методу зворотнофазового випарювання із обробленням ультразвуком, визначено контрольні параметри цієї технології. Ліпосоми, отримані на основі C₁₆-SM, більш інтенсивно взаємодіють із 7-AMК-флуорофором сполуки R-203 у буфері.

Ключові слова: технологія; ліпосоми; фосфоліпіди; фармацевтична розробка; флуоресценція

R. G. Redkin¹, N. F. Orlovetska², O. S. Dankevich²¹ Research & Development Centre of PRO.MED.CS Praha a.s., Czech Republic² National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine

Preparation of liposomes with phospholipids and study of their photo-interaction with a fluorophore-containing compound

Aim. To substantiate the optimal technology for obtaining two types of bio-related liposomes based on the composition of dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine (DPPC) or palmitoyl-sphingomyelin-N-hesadecanoyl-D-erythrosphingosylphosphorylcholine (C₁₆-SM) with cholesterol and study their interaction with a fluorophore-containing compound.

Materials and methods. To prepare liposomal vesicles based on phospholipids – DPPC, C₁₆-SM and cholesterol (1:1) the method of reverse-phase evaporation on a rotary vacuum evaporator Büchi-210 was used. Ultrasonic homogenization was performed using a Jeken (Codyson) PS-08A sonicator. A fluorescent compound R-203 (5'-isopropyl-3'-((4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)-carbamoyl)-2-oxospiro-[indoline-3,2'-pyrrolidine]-4'-carbon) with a 7-amino-coumarin (7-AMC) fluorophore was obtained by the synthesis previously described. Liposome particle size determination was measured using laser diffraction on a LA-960 Laser Particle Size Analyzer (Horiba Scientific). The measuring range of the device is 0.01 μ m to 5000 μ m; guaranteed accuracy is ± 0.6 %. Fluorescence spectra were recorded in the emission range of 365... 650 nm on a FluoroMax[®]-4 spectrofluorometer (Horiba Scientific) at an excitation wavelength of 350 nm. R-203 fluorescence spectra ($\lambda_{em} = 412$ nm) were measured in a 500 μ l cuvette.

Results and discussion. Target liposomes were obtained based on the composition of DPPC or C₁₆-SM phospholipids with cholesterol in the ratio of phospholipids and cholesterol 1:1. The optimal size of liposomes of about 100 nm was achieved for the composition of C₁₆-SM: cholesterol (1:1). The calculated packaging parameter (γ) allowed us to conclude that in the case of DPPC and C₁₆-SM phospholipids, the parameter $\gamma < 1$, i.e. the molecules of these lipids had a cone shape and were packed in phase I type where the molecules could form spherical (vesicles) and / or cylindrical micelles. However, the C₁₆-SM phospholipid has a larger polar area of the molecule (a_0), in contrast to the DPPC molecule. Fluorescence spectra of R-203 interaction with DPPC : cholesterol and C₁₆-SM : cholesterol (1:1)

liposomes in phosphate-buffered saline pH 7.4 were studied. In the interaction of the fluorescent substance R-203, quenching of the fluorescence intensity was observed according to the Stern–Volmer equation; it was more intense for C₁₆-SM: cholesterol liposomes than in the case of DPPC: cholesterol liposomes.

Conclusions. The optimal technology for obtaining two types of bio-related liposomes based on the composition of DPPC or C₁₆-SM with cholesterol (1: 1) has been proposed using the method of reverse phase evaporation with ultrasound treatment; the control parameters of their technology have been determined. Liposomes based on C₁₆-SM interact more intensively with the 7-AMK fluorophore of the compound R-203 in the buffer.

Key words: technology; liposomes; phospholipids; pharmaceutical development; fluorescence

Вступ. Від часів першого опису ліпосом у науковій літературі Bangham 1964 року [1] ці утворення незмінно залишаються важливим об'єктом як вивчення фундаментальних властивостей біологічних мембран, так і створення нових лікарських форм для доставляння біологічно активних речовин (БАР). Як відомо, ліпосоми – це наночастинки, або мікроскопічні везикули, які формуються із бішарів поверхнево-активних ліпідів подібно до клітинних мембран та здатні до самоорганізації з утворенням внутрішнього компартмента, що містить водну фазу. Ця унікальна структура надає ліпосомам потужну здатність інкапсулювати гідрофільні, гідрофобні, амфіфільні молекули лікарських засобів різної структури та молекулярної ваги. Прогрес останніх десятиліть у вивченні та технології ліпосом дозволив також блискавично впроваджувати нові лікарські форми, зокрема РНК-вакцини у вигляді ліпосом [2].

За будовою ліпосоми розрізняють такі: багат шарові везикули (від англ. *multilamellar vesicles* – MLV, 0,1-15 мкм), малі одношарові везикули (від англ. *small unilamellar vesicles* – SUV, 25-50 нм), великі одношарові везикули (від англ. *large unilamellar vesicles* – LUV, 100 нм–1 мкм), гігантські одношарові пухирці, або пухирчасті везикули (від англ. *giant unilamellar vesicles* – GUV, 1,0-200 мкм), а також мультивезикулярні везикули (від англ. *multivesicular vesicles* – MVV, 1,6-10,5 мкм) [3]. Невеликі ліпосоми з діаметром близько 100 нм часто використовують як носії ліків завдяки їх безпечності та кращому розподілу в тканинах. Властивості й подальше застосування ліпосом залежать від їхньої хімічної природи й композиції ліпідів, які є основним класом мембранних ліпідів. Зазвичай використовують соєві або ячні фосфоліпіди, які відрізняються високою фізіологічною толерантністю та легко метаболізуються. Крім того, властивості ліпосом також залежать від способу їх приготування, наприклад, метод струшування, або заміна розчинника (етанолу чи ефіру), метод випаровування зворотної фази, заморожування-розморожування або дегідратація-регідратація [4]. Проте більшість зазначених методів приготування ліпосом (метод тонкоплівкової гідратації, метод випаровування зворотної фази, метод заміни розчинника, діаліз ПАВ тощо) передбачають як перший крок розчинення ліпідів використання легких галогенорганічних розчинників, наприклад, хлороформу, дихлорметану, фреонів тощо. Згідно з цими методами ліпіди розчиняються в органічних розчинниках. Проблемою в цьому випадку є те, що розчинники не можна абсолютно повністю видалити з кінцевого продукту, що підвищує ризик

токсичності домішок розчинників і впливає на стабільність ліпосомальних везикул згодом. Тому під час розроблення технології важливо переконатися, що ліпосомальний продукт не містить розчинників I класу (наприклад, бензолу й 1,2-дихлоретану) та містить обмежену кількість розчинників II класу (наприклад, хлороформу, дихлорметану, метанолу), щоб відповідати вимогам Європейської або Американської фармакопеї.

Розпізнавання ліпосом цільовою тканиною, клітинами або органелами залежить від вибору ліпідів для приготування ліпосомної мембрани. Так, дипальмітоїл-*L*- α -фосфатидилхолін (DPPC) є найбільш часто використовуваним серед синтетичних фосфоліпідів. Зокрема, використання як заміника легеневого сурфактанта DPPC, відомого як кольфосцерил пальмітат, також вважають перспективним для розробки систем доставляння протитуберкульозних препаратів у легені, бо він сприяє кращому проникненню в альвеоли за рахунок спорідненості з власними альвеоларними фосфоліпідами [5]. Кольфосцерилу пальмітат ефективний у зниженні поверхневого натягу легеневої рідини, тим самим підвищує еластичність легень, запобігаючи альвеоларному колапсу та покращуючи дихання. Тому цей препарат використовують для лікування респіраторного дистрес-синдрому в немовлят.

Іншим перспективним кандидатом для отримання ліпосомальних продуктів є сфінгомієліні (SM), які утворюють один з основних класів мембранних фосфоліпідів у еукаріотичних організмах, складаючи разом із класом фосфатидилхолінів понад 50 % мембранних фосфоліпідів [6].

Холестерол є звичайним компонентом біологічних мембран. Додавання у композицію ліпосом холестеролу призводить до їх максимального наближення до біологічних мембран та підвищує стабільність ліпосомальних везикул у середовищі плазми крові. Холестерол може регулювати плинність і проникність ліпосомальних везикул, що покращує їхні механічні властивості [3].

Метою роботи було обґрунтування оптимальної технології отримання двох видів біоспоріднених ліпосом на основі композиції DPPC або SM із холестеролом та дослідження їх фотовзаємодії із флуорофоромісткою сполукою.

Матеріали та методи. Для отримання ліпосом використовували 99 % дипальмітоїл-*L*- α -фосфатидилхолін (DPPC, або кольфосцерил пальмітат) з М.м. 734.0 г/моль, пальмітоїлсфінгомієлін-*N*-гексадеканоїл-*D*-еритросфінгозилфосфорилхолін (C₁₆-SM,

або яєчний сфінгомієлін) з М.м. 703.0 г/моль виробництва компанії Avanti, а 5-холестен-3 β -ол, або холестерол (USP стандарт, Chol) з М.м. 386.7 г/моль і розчинники – виробництва Sigma-Aldrich. Приготування ліпосомальних везикул проводили методом попарного змішування приготованих 10 мг/мл розчинів DPPC (735 мкл) або C₁₆-SM (704 мкл) із 10 мг/мл розчином холестеролу (386 мкл) у хлороформі в співвідношенні 1:1 моль та подальшим зворотнотазовим випаровуванням [7]: до суміші відповідних ліпідів у суху круглдонну колбу з подовженою горловиною об'ємом 50 мл додавали розчинені ліпіди, а потім розчинник видаляли за зниженого тиску на роторному випаровувачі. Плівку ліпідів одержували на ротаційному вакуумному випаровувачі Büchi-210 з вакуумним контролером V-850 за залишкового тиску 0,03 атм. Потім колбу продували азотом і отриману плівку ліпідів знову розчиняли в органічній фазі діетилового етеру, у якому утворюються везикули зі зворотного фазою. На фінальній стадії проводили гідратацію ліпідної плівки за додавання фосфатно-сольового буфера рН 7.4, який готували згідно з ДФУ: 80.0 г натрію хлориду Р, 2.0 г калію гідрофосфату Р, 14.3 г динатрію гідрофосфату дигідрату Р та 2.0 г калію хлориду Р, перемішуючи, розчиняли в 1000 мл води Р, попередньо розводячи отриманий розчин у 10 разів водою Р. За уведення водорозчинних сполук у ліпосоми БАР попередньо розчиняли у фосфатно-сольовому буфері. Отриманий розчин гомогенізували ультразвуком до утворення гомогенного опалесцентного розчину. Обробляли розчин ліпосом ультразвуком за допомогою сонікатора Jeken (Codyson) PS-08A, 1,3 л, 70 Вт із частотою 40000 Гц за температури не вище 0-5°C. Потім суміш поміщали в роторний випарник і органічний розчинник видаляли за зниженого тиску за 20-25 °С, зі швидкістю обертання близько 200 об/хв. Отриманий фінальний сироподібний продукт доводили тим же фосфатно-сольовим буфером із рН 7,4 до об'єму 50 мл, отримуючи концентрацію ліпосом 20 мМ.

Критичний параметр пакування (CPP або γ) кожного з ліпідів розраховано за методикою [8]. Молекулярні дескриптори молекул ліпідів, зокрема молекулярний об'єм молекули ліпідів й топологічну площу полярної поверхні молекул ліпідів (TPSA), було розраховано за допомогою платформи хемоінформатики <https://www.molinspiration.com/> (Університет Братислави, Словаччина), з використанням специфікації спрощеного подання молекул у рядку введення (SMILES), попередньо згенерованих за допомогою OEChem 2.3.0 (версія PubChem от 2021.05.07).

Значення різниці значущості (P) та 95 % СІ програми Excel (Microsoft Office 2007) на платформі Windows 8.

Визначення розміру частинок ліпосом виконано за допомогою лазерної дифракції на приладі LA-960 Laser Particle Size Analyzer (Horiba Scientific). Діапазон вимірювання приладу складає від 0,01 мкм до 5000 мкм; гарантована точність $\pm 0,6\%$. Як розчинник використовували вищезазначений фосфатний буфер.

Сполуку R-203 (5'-ізопропіл-3'-((4-метил-2-оксо-2H-хромен-7-іл)-карбамоіл)-2-оксоспіро-[індолін-3,2'-піролідін]-4'-карбонову кислоту) із 7-амінокумариновим флюорофором отримували шляхом двостадійного синтезу з відповідного аміду 7-амінокумарину (7-АМК) та малеїнової кислоти з подальшою трикомпонентною реакцією отриманого N-ариламіду з L-валіном та ізатином за методикою [9]. Структуру отриманої речовини було схарактеризовано методами ЯМР ¹H, ¹³C та мас-спектрометрії. Реєстрацію спектрів флюоресценції проводили в діапазоні емісії 365...650 нм на спектрофлуориметрі FluoroMax[®]-4 (Horiba Scientific) за довжини збуджувальної хвилі 350 нм. Спектри флюоресценції R-203 ($\lambda_{em} = 412$ нм) записували в кюветі 500 мкл у середовищі буфера та/або за додавання ліпосом за концентрації 1,5, 3,0 та 4,5 мкМ R-203. Отримані криві емісії нормалізували, а як стандарт використали розчин речовини R-203 у фосфатному буфері із рН 7.4 без додавання ліпосом. Дослідження взаємодії R-203 з ліпосомами проводили за фінальної концентрації ліпосом 0,5 мМ.

Результати та їх обговорення. Для формування композиції ліпідної плівки та отримання ліпосом було використано дипальмітоїл-L- α -фосфатидилхолін (DPPC) з Мм 734.0 г/моль, пальмітоїлсфінгомієлін-N-гексадеканоїл-D-еритросфінгозилфосфорилхолін (C₁₆-SM) з Мм 703.0 г/моль, холестерол (Chol) з Мм. 386.7 г/моль, структуру яких наведено на рис. 1. Як бачимо з рисунку, на розділ від DPPC молекула фосфоліпідів C₁₆-SM містить амідний зв'язок та вільну спиртову групу, що робить їх більш полярними та сприяє формуванню водних зав'язків із молекулами води за гідратації. Окрім того, обидва фосфоліпіди мають ідентичну фосфохолін-цвіттер-іонну гідрофільну головну групу, інтерфейсну область і два довгих вуглеводневих ланцюги, які утворюють гідрофобний амфільний домен. Стрілками показано умовну орієнтацію молекул ліпідів за формування ліпідних везикул. За даними літератури, розмір фосфоліпідних молекул складає не більше 3 нм, що дозволяє їм легко інкорпорувати менші за розміром молекули холестеролу. Холестерол додається в бішари ліпосом і збільшує їх упорядкований стан. Як відомо, він має гідрофільну «головку» і гідрофобний «хвіст» з меншою гнучкістю і тим самим покращує структурну жорсткість ліпосом на основі фосфатидилхоліну, бо в рідкокристалічній фазі холестерол обмежує рухливість ацильних ланцюгів фосфоліпідів.

У фазі гелю присутність холестеролу в структурі мембрани послаблює взаємодію Ван-дер-Ваальса між вуглеводневими ланцюгами жирних кислот і запобігає кристалізації ліпосом. Крім того, після потрапляння в плазму крові ліпосоми піддаються дестабілізуювальному впливу ліпопротеїнів, а додавання холестеролу в цьому випадку підвищує стабільність. Ліпідну плівку ліпосом було отримано у співвідношенні фосфоліпідів та холестеролу 1:1, або 50 % за молями. Здатність молекул ліпідів до самоорганізації у водних середовищах з утворенням надмолекулярних структур є фундаментальною властивістю

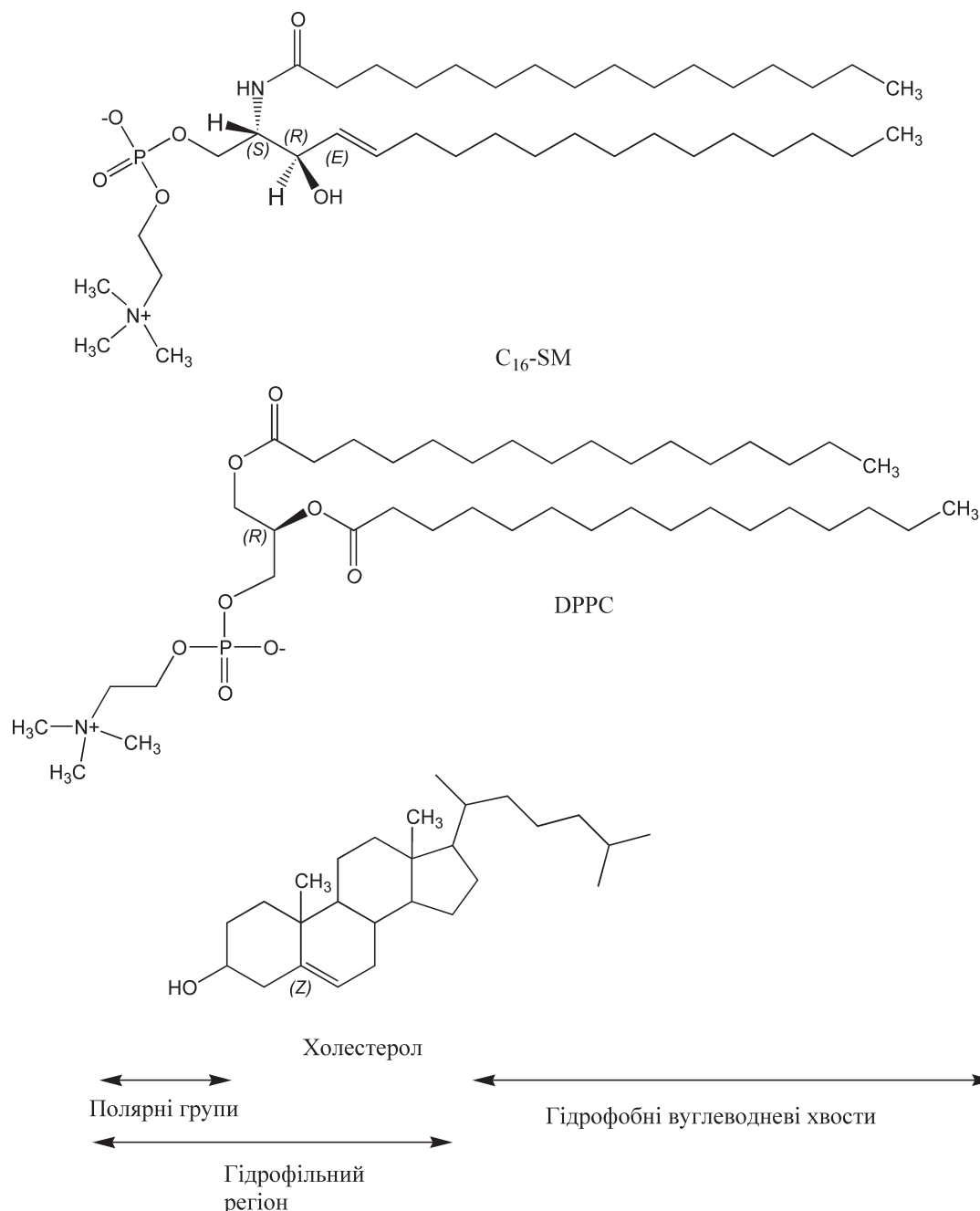


Рис. 1. Структура ліпідів, використаних для приготування ліпосом у цьому дослідженні

цього класу макромолекул, яку якісно описано відомим коефіцієнтом форми або критичним параметром пакування (CPP або γ), уперше введеним Ізраелішвілі та співавторами [10], який виражають рівнянням: $\gamma = V / a_0 \times l_c$, де значення V – молекулярний об'єм молекули ліпиду, a_0 – площа полярних поверхонь молекули ліпиду (TPSA), та l_c – довжини ланцюга. Тож для обраних нами ліпідів було розраховано об'єми розчинів, необхідні для отримання ліпосом, та параметри пакування для кожного ліпиду (табл. 1).

Розрахований параметр (γ) дозволяє легко оцінити та передбачити форму окремої амфіфільної молекули у складі фаз, а також зробити висновок про характер макромолекулярних структур, які вона утворює на межі розділу ліпід – вода. Так, у випадку

фосфоліпідів DPPC та C₁₆-SM параметр $\gamma < 1$, що означає, що ці ліпіди будуть мати форму конуса та упаковуватися у фазу I типу, де молекули можуть утворювати сферичні (везикули), циліндричні (гексагональні H_I) міцели. Однак, як видно, яєчний фосфоліпід C₁₆-SM має більшу полярну площу молекули (a_0 або TPSA), на відміну від молекули DPPC. Тоді як молекули холестеролу утворюють інверсну гексагональну фазу II (H₂), набуваючи оберненої конічної форми молекули, бо мають $\gamma > 1$.

Технологічні стадії та контрольні параметри отримання ліпосом наведено в табл. 2.

Для отримання ліпосом нами було застосовано метод зворотnofазового випарювання, коли використовують повторне упарювання розчину після гідратації ліпідної плівки з оброблянням другим розчином. У цій методиці ми застосували ефір (стадії 1-6).

Таблиця 1

Розрахунки об'ємів розчинів, необхідних для отримання ліпосом (1:1), та параметри пакування

Ліпід	Mm, г/моль	C, моль/мл	Об'єм розчину, мкл	V, Å ³	a ₀ , Å ²	l _c , Å	γ	Висновок
DPPC	734	1,42 × 10 ⁻⁵	735	773,67	60	17,6	0,733	γ < 1, Фаза I типу
C ₁₆ -SM	703	1,36 × 10 ⁻⁵	704	750,98	71	19,0	0,557	γ < 1, Фаза I типу
Холестерол	386,7	2,59 × 10 ⁻⁵	386	423,13	19	17,5	1,273	γ > 1, Фаза II типу

Таблиця 2

Технологічні стадії отримання розчинів ліпосом

Стадія	Назва	Сировина, напівпродукти	Контрольні параметри
1	Приготування розчинів ліпідів	DPPC C ₁₆ -SM Холестерол Хлороформ	Точність відважування, повнота розчинення ліпідів
2	Відмірювання та змішування розчинів у мольному співвідношенні 1:1	Розчини ліпідів Суміш ліпідів у хлороформі	Точність відмірювання розчинів
3	Одержання плівки ліпідів на ротаційному вакуумному випаровувачі	Суміш ліпідів (плівка)	Повнота видалення хлороформу Контроль спінування
4	Гідратація ліпідної плівки	Фосфатно-сольовий буфер рН 7,4 (за необхідності з розчиною БАР)	Змішування рН
5	Гомогенізація первинної емульсії ультразвуком	Первинна емульсія	Гомогенність Опалесценція розчину
6	Випарювання з отриманням концентрату та його «сушіння» ефіром	Концентрат Ефір	Повнота видалення хлороформу та ефіру
7	Розведення отриманого концентрату ліпосом фосфатно-сольовим буфером	Концентрат та фінальний розчин ліпосом у буфері	Гомогенність рН
8	Гомогенізація фінальної емульсії ультразвуком	Розведений концентрат емульсії ліпідів	Гомогенність Опалесценція розчину Розмір ліпідних везикул

Ефір додають порціями 3 рази по 1000 мкл та після кожного додавання його випарюють у вакуумі. Цей прийом дозволяє краще видалити такий розчинник, як хлороформ, а також увести в ліпосоми водонерозчинні сполуки. Як гомогенізацію використовували оброблення ультразвуком (сонікацію) на стадіях 5 та 8. Такий підхід дозволяє отримати ліпосоми з везикулами меншого розміру й досягнути кращої гомогенізації (рис. 2).

Визначення розміру частинок отриманих ліпосом за допомогою лазерної дифракції наведено в табл. 3. У випадку ліпосом C₁₆-SM : холестерол (1:1) розмір отриманих везикул досягає близько 100 нм, тоді як у випадку ліпосом DPPC : холестерол (1:1) розмір везикул є достовірно вищим (P < 0,05).

На наступному етапі досліджень було вивчено фото взаємодію отриманих ліпосом C₁₆-SM : холестерол та DPPC : холестерол (1:1) із флюорофор-місткою сполукою R-203. Як відомо, деякі ацильні похідні 7-амінокумарину (7-АМК) володіють протитуберкульозною активністю. Синтезована нами похідна спіро-2-оксіндолу – 5'-ізопропіл-3'-((4-метил-2-оксо-2H-

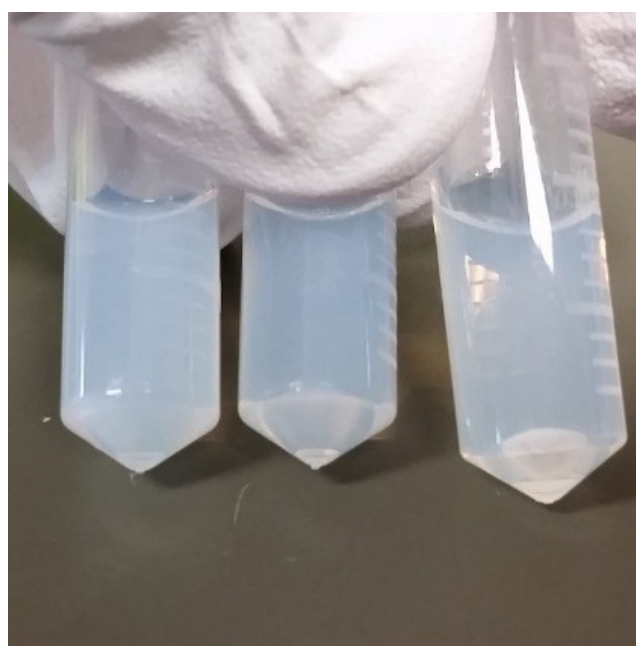


Рис. 2. Опалесценція отриманих фінальних розчинів ліпосом

Таблиця 3

Порівняння композиції та розміру отриманих ліпосом

Склад ліпосом	Мольне співвідношення композиції (фосфоліпід : холестерол)	Середовище гідратації ліпосом	Пересічне значення розміру везикул, nmSD	Число аналітичних зразків	Значення різниці значущості (P) та 95 % CI
DPPC/Chol	1:1	фосфатно-сольовий буфер pH 7.4	152,521,4	3	P = 0,0441* [106.8660 2.3340]
C ₁₆ -SM/Chol	1:1	фосфатно-сольовий буфер pH 7.4	97,924,6	3	

Примітка: SD – стандартне відхилення; 95 % CI – 95 % довірчий інтервал (CI);* P < 0,05.

хромен-7-ил)карбамоїл)-2-оксоспіро-[індолін-3,2'-піролідін]-4'-карбонової кислоти (R-203) в докінгу на моделі пантотенат синтази *M. tuberculosis* продемонструвала високу інгібувальну здатність. Враховуючи, що ліпіди складають близько 40 % оболонки мікобактерій, ми вирішили попередньо оцінити здатність отриманих сполук взаємодіяти з модельними ліпосомами *in vitro* для корекції структури сполук і посилення їх проникності крізь мембрани на прикладі взаємодії з ліпосомами. Через те що флуоресцентне випромінювання хромофора може бути дуже чутливим до динаміки й полярності його безпосереднього оточення, нами було проведено флуоресцентні експерименти для дослідження характеристики отриманих ліпосом і БАР, що можна використати для пояснення механізмів гідратації та рухливості в ліпідних шарах, а також для вибору оптимальної композиції біоспоріднених ліпосом.

В експериментах з вимірювання спектрів абсорбції (λ_{abs} 337 нм) та емісії речовини R-203 було визначено, що вона має максимальний пік флуоресцентного випромінювання (F), який є за 412 нм, коли розчин опромінюють у діапазоні емісії 365...650 нм. Отримані спектри флуоресценції R-203 за взаємодії з ліпосомами DPPC : холестерол та C₁₆-SM : холестерол (1:1) наведено на рис. 3. (А та Б відповідно). Отриману інтенсивність флуоресценції речовини

R-203 у фосфатно-сольовому буфері з pH 7.4 вважали за F₀. Інтенсивність флуоресценції виражено у відносних одиницях (A.U., arbitrary units).

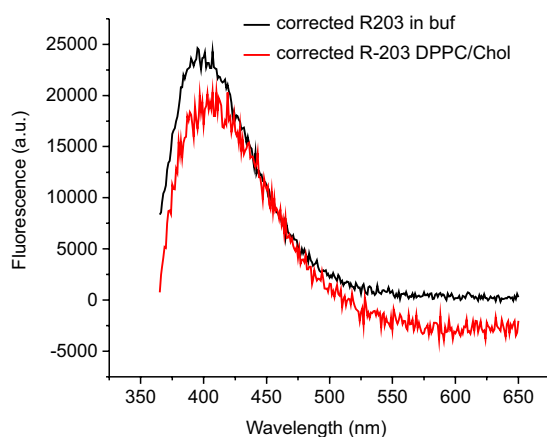
Аналіз отриманих спектрів емісії засвідчив більш інтенсивну флуоресценцію R-203 за його взаємодії з ліпосомами C₁₆-SM : холестерол (рис. 3Б). Однак в обох випадках у разі додавання ліпосом у систему флуорофор – буфер спостерігали поступове гасіння флуоресценції внаслідок статичної та динамічної взаємодії сполуки з ліпосомами в розчині та зміни мікрооточення молекули флуорофора. Тобто спостерігали так зване явище гасіння флуоресценції, яке описують рівнянням Штерна–Фольмера (Stern–Volmer), що може бути використано, щоб описати залежність механізму гасіння флуоресценції від концентрації [11]:

$$F_0/F = K_{sv} [C] + 1,$$

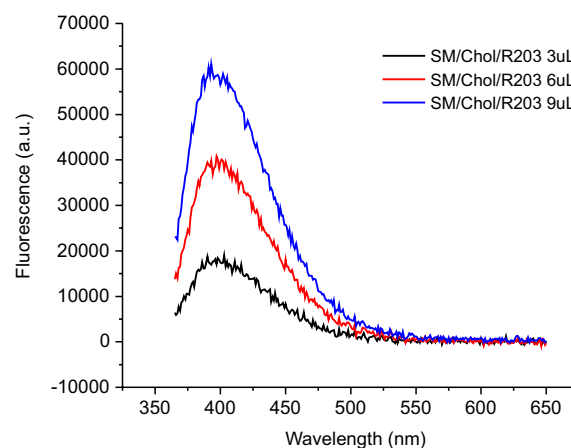
де K_{sv} – постійна Штерна–Фольмера;
[C] – концентрація ліганду;

F₀ і F – інтенсивність флуоресценції піка за 412 нм та довжини хвилі збудження в діапазоні емісії 365...650 нм без і з додаванням ліпосом відповідно.

За взаємодії флуоресцентної речовини R-203 спостерігали поступове гасіння інтенсивності флуоресценції проти F₀ у буфері. Графік, отриманий для функції інтенсивності флуоресценції F₀/F рівнянням



А



Б

Рис. 3. Спектри флуоресценції R-203 за взаємодії з ліпосомами: А – флуоресценція R-203 з ліпосомами DPPC : холестерол (1:1) ; Б – зростання флуоресценції R-203 за взаємодії з ліпосомами C₁₆-SM : холестерол (1:1)

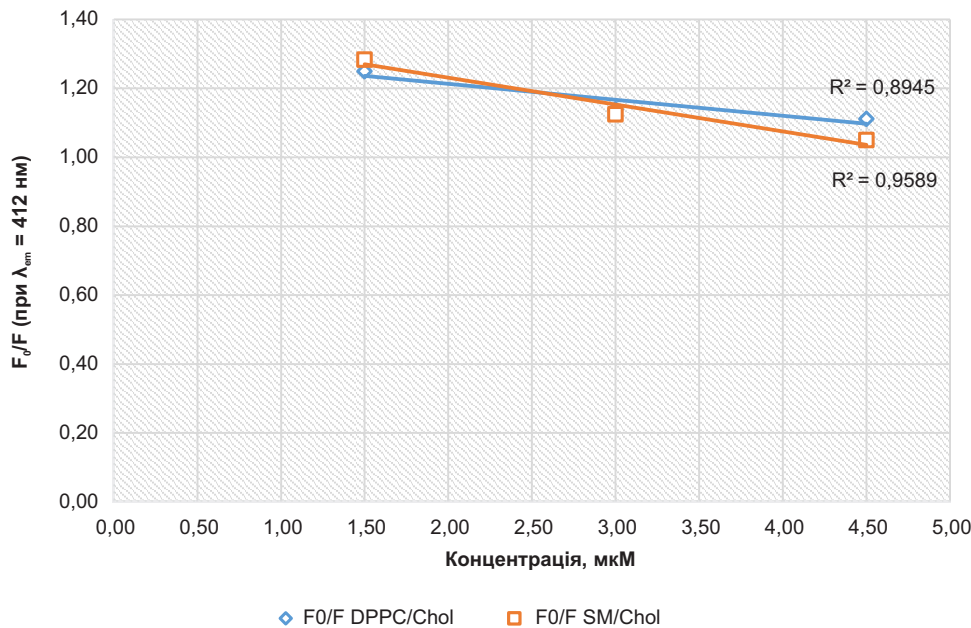


Рис. 4. Графік залежності відносної інтенсивності флуоресценції ліпосом F_0/F від концентрації флуоресцентної сполуки R-203 у фосфатному буфері за pH 7,4

Штерна–Фольмера від концентрації R-203, демонструє лінійність у діапазоні 1,5–4,5 мкМ з коефіцієнтом регресії $R^2 = 0,9589$ у випадку ліпосом C_{16} -SM : холестерол та $R^2 = 0,8945$ – для ліпосом DPPC : холестерол (рис. 4).

Хоча зміна інтенсивності флуоресценції була найвищою за концентрації 4,5 мкМ, проте за загальноприйнятими критеріями ця різниця між двома розчинами ліпосом є статистично незначущою (двостороннє значення $P = 0,2369$). Вище гасіння флуоресценції сполуки R-203, яка містить кумариновий флуорофор, можна пояснити кращою гідратацією везикул C_{16} -SM : холестерол проти менш полярних ліпосом DPPC : холестерол, приготованих у тому ж мольному співвідношенні. Попри те, що обидва фосфоліпідні компоненти мають подібний параметр пакування $\gamma < 1$, вони суттєво розрізняються в полярності та структурі полярних функціональних груп. У випадку C_{16} -SM це, очевидно, проявляється як вплив функцій –CONH- та вільної OH-групи, які зумовлюють краще утворення водневих зв'язків та вище значення площі полярних поверхностей молекули C_{16} -SM ($a_0 = 71 \text{ \AA}^2$ проти 60 \AA^2 у молекули DPPC на межі розділу фаз ліпід – вода). Молекули R-203, що несуть флуорофор 7-АМК, очевидно, здатні брати участь у взаємодії з полярними групами ліпосом, наявними на зовнішньому шарі ліпосом, утворених, зокрема, C_{16} -SM, які несуть OH-групи. Отже, доступність вільних електронів стає мінімальною, щоб реагувати на збудження молекули 7-АМК, очевидно, можливість переходу $n-\pi^*$ стає меншою і відбувається зменшення інтенсивності флуоресценції.

За однакового способу упакування молекул фосфоліпідів під час утворення фази I типу отримані ліпосоми C_{16} -SM : холестерол є більш полярними, ніж ліпосоми DPPC : холестерол та краще взаємодіють з гідратною плівкою. Отже, хімічна структура

фосфоліпиду впливає на процес гідратації ліпідної плівки та взаємодію з мікрооточенням, зокрема й потенційними БАР, що варто враховувати під час розроблення композиції ліпосомальних лікарських форм.

Висновки та перспективи подальших досліджень

1. На основі методу зворотнофазового випарювання з обробленням ультразвуком запропоновано оптимальну технологію отримання двох видів біоспоріднених ліпосом на базі композиції DPPC або C_{16} -SM із холестеролом (1:1). Визначено контрольні параметри технологічних стадій їх отримання.

2. Визначено розмір везикул отриманих ліпосом DPPC : холестерол та C_{16} -SM : холестерол (1:1) на їх трьох серіях у буферному розчині за допомогою лазерної дифракції. З'ясовано, що більш оптимальний розмір 100 нм у таких технологічних умовах вдається досягти у випадку ліпосом C_{16} -SM : холестерол (1:1).

3. Обчислено параметри пакування використовуваних ліпідів та визначено, що компоненти фосфоліпідів (DPPC та C_{16} -SM) у ліпосомах мають подібний параметр пакування $\gamma < 1$ й утворюють фазу I типу, однак вони суттєво розрізняються в полярності й структурі полярних функціональних груп, що зрештою позначається на їхніх фармакотехнологічних властивостях, зокрема на розмірі везикул.

4. Вивчено фотовзаємодію отриманих ліпосом C_{16} -SM : холестерол та DPPC : холестерол (1:1) із флуорофор-місткою сполукою R-203. Ліпосоми, отримані на основі C_{16} -SM, більш інтенсивно взаємодіють із 7-АМК-флуорофором сполуки R-203, очевидно, внаслідок кращої гідратації та зміни мікрооточення флуорофора.

5. Репрезентоване дослідження покращує раціональні підходи до розроблення технології нових ліпосомальних форм лікарських засобів.

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *J. Mol. Biol.* 1965. Vol. 13, № 1. P. 238–252. DOI: 10.1016/S0022-2836(65)80093-6.
2. Marasini N., Ghaffar K. A., Skwarczynski M., Toth I. Liposomes as a Vaccine Delivery System. *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development*. 2016. P.221–239. DOI: 10.1016/b978-0-323-39981-4.00012-9.
3. Agustina G. H., Juan M. F. R. The Role of Liposomes in Analytical Processes. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2005. Vol. 24, № 2. P. 9–19.
4. Mozafari M. R. Liposomes: An Overview of Manufacturing Techniques. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2005. Vol. 10, № 4. P. 711–719.
5. Chimote G., Banerjee R. Evaluation of antitubercular drug-loaded surfactants as inhalable drug-delivery systems for pulmonary tuberculosis. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2009. Vol. 89, № 2. P. 281–292.
6. Barenholz Y., Thompson T. E. Sphingomyelin: biophysical aspects. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1999. Vol. 102, № 1-2. P. 29–34. DOI: 10.1016/s0009-3084(99)00072-9.
7. Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1978. Vol. 75, № 9. P. 4194–4198. DOI: 10.1073/pnas.75.9.4194.
8. Kulkarni C. V. Calculating the ‘Chain Splay’ of Amphiphilic Molecules: Towards Quantifying the Molecular Shapes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2019. Vol. 218. P. 16-21. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2018.11.004.
9. Редькін Р. Г. Синтез спіро-2-оксіндольних похідних імідів піролідин-3,4-дикарбонової кислоти із залишками біогенних сірковмісних амінокислот та їх антигіпоксична активність. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2017. Т. 15, вип. 2. С. 55-67.
10. Israelachvili, J. N., Marčelja S., Horn R.G. Physical principles of membrane organization. *Quarterly reviews of biophysics*. 1980. Vol. 13, № 2. P. 121-200. DOI: 10.1017/S0033583500001645.
11. Moon A. Y., Poland D. C., Scheraga H. A. Thermodynamic Data from Fluorescence Spectra. I. The System Phenol-Acetate1. *The Journal of Physical Chemistry*. 1965. Vol. 69, № 9. P. 2960–2966. DOI: 10.1021/j100893a022.

REFERENCES

1. Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. (1965). Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *J. Mol. Biol.*, 13, 238–252. doi: 10.1016/S0022-2836(65)80093-6.
2. Marasini, N., Ghaffar, K. A., Skwarczynski, M., Toth, I. (2017). Liposomes as a Vaccine Delivery System. *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development*, 221–239. doi: 10.1016/b978-0-323-39981-4.00012-9.
3. Agustina, G. H., Juan, M. F. R. (2005). The Role of Liposomes in Analytical Processes. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 24 (2), 9–19.
4. Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: An Overview of Manufacturing Techniques. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 10 (4), 711–719.
5. Chimote, G., Banerjee, R. (2009). Evaluation of antitubercular drug-loaded surfactants as inhalable drug-delivery systems for pulmonary tuberculosis. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 89 (2), 281–292.
6. Barenholz, Y., Thompson, T. E. (1999). Sphingomyelin: biophysical aspects. *Chemistry and Physics of Lipids*, 102 (1-2), 29–34. doi: 10.1016/s0009-3084(99)00072-9.
7. Szoka, F., Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75 (9), 4194–4198. doi: 10.1073/pnas.75.9.4194.
8. Kulkarni, C. V. (2019). Calculating the ‘Chain Splay’ of Amphiphilic Molecules: Towards Quantifying the Molecular Shapes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 218, 16-21.
9. Redkin, R. H. (2017). *Zhurnal orhanichnoi ta farmatsevtichnoi khimii*, 15 (2), 55-67.
10. Israelachvili, J. N., Marčelja, S., Horn, R. G. (1980). Physical principles of membrane organization. *Quarterly reviews of biophysics*, 13, 121-200.
11. Moon, A. Y., Poland, D. C., Scheraga, H. A. (1965). Thermodynamic Data from Fluorescence Spectra. I. The System Phenol-Acetate1. *The Journal of Physical Chemistry*, 69 (9), 2960–2966. doi: 10.1021/j100893a022.

Відомості про авторів:

Редькін Р. Г., кандидат фармацевт. наук, доцент, Науково-дослідний центр PRO.MED.CS Praha a.s., Чеська Республіка.

E-mail: ruslan.red.chem@gmail.com. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4412-0496>

Орловецька Н. Ф., кандидатка фармацевт. наук, доцентка кафедри технології ліків, Національний фармацевтичний університет

Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: ninelorlv@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9417-5236>

Данькевич О. С., кандидатка фармацевт. наук, доцентка кафедри технології ліків, Національний фармацевтичний університет

Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: os.dank@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3030-2769>

Information about authors:

Redkin R. G., Candidate of Pharmacy (Ph.D), associate professor of the Research & Development Centre of PRO.MED.CS Praha a.s.,

Czech Republic. E-mail: ruslan.red.chem@gmail.com. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4412-0496>

Orlovetska N. F., Candidate of Pharmacy (Ph.D), associate professor of the Drug Technology Department, National University

of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: ninelorlv@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9417-5236>

Dankevych O. S., Candidate of Pharmacy (Ph.D), associate professor of the Drug Technology Department, National University

of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: os.dank@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3030-2769>

Надійшла до редакції 28.01.2022 р.