

СОЗДАНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ СТРУКТУР НА ОСНОВЕ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СВОЙСТВ

Исследована возможность получения липосом из алкилоксибензолов, различающихся длиной алкильного радикала. Определены концентрационные диапазоны образования липосомальных структур и их размеры. Подтверждена возможность инкапсуляции неполярных веществ внутри полученных структур, а также оценена их стабильность при хранении и под действием таких факторов как температура и обработка ультразвуком.

Ключевые слова: алкилоксибензолы, резорцинольные липиды, липосомы, пирен.

Поиск и экспериментальное исследование липосом (коллоидных систем, представляющих собой замкнутые сферические образования, внутри которых расположено водное ядро) является одним из приоритетных направлений современной биомедицинской и фармацевтической химии [1]. Практическое использование липосом связано с их способностью транспортировать самые разнообразные фармакологические агенты в последствии биodeградируя в организме [2]. При этом инкапсулирование активных компонентов наряду со снижением общетоксического действия на организм, защищает их от окислительной и микробиологической порчи [3].

В качестве материала для построения липосом в последнее десятилетие широко исследуются резорцинольные липиды [4] – гомологи алкилоксибензолов (АОБ) – низкомолекулярных веществ растительного [5] и микробного происхождения [6], которые обладают антимикробной [7], фотозащитной [8]-[9], антиоксидантной [10] и другими биологическими активностями [11]. Амфифильное строение определяет их способность к взаимодействию с клеточными мембранами, а также друг с другом, ведущим к образованию надмолекулярных структур [12].

В этой связи целью настоящей работы является создание липосомальных структур на основе химических аналогов АОБ природного происхождения, определение их размеров, стабильности и потенциала инкапсуляции.

При проведении исследований использованы химически синтезированные АОБ со степенью очистки 99.9%, при этом использованные гомологи отличались длиной и расположением углеводородного (алкильного) радикала: гексилрезорцинол (1,3-диокси-4-гексилбензол; C₆-АОБ) и додецилрезорцинол (1,3-диокси-5-додecilбензол;

C₁₂-АОБ) (Sigma, США). Водные растворы АОБ в диапазоне концентраций 5×10⁻⁵ – 10⁻² М готовились путем внесения навесок в деионизированную воду (Новосибхимфарм, Россия). Инкубация растворов АОБ осуществлялась в течение 2 недель при 4°C. Для проверки инкапсулирования был использован флуоресцентный зонд пирен (Sigma, США), служащий аналогом гидрофобного вещества и чувствительный к изменению полярности окружения [13], его растворяли в этаноле и аликвоту этого раствора в объёме 10 мкл добавляли к растворам АОБ так, чтобы конечная концентрация составляла 10⁻⁷ М. Смешивание растворов АОБ и пирена проводили непосредственно перед измерением в 0, 1, 7 и 14 день. Влияние различных факторов на процесс липосомообразования в растворах АОБ исследовалось при нагревании до температуры 95°C и выдерживании в течении 10 минут, а также УЗ-озвучивании в течение 30 минут с частотой 50 Гц непосредственно после приготовления растворов.

Для измерения спектров флуоресценции пирена использовался спектрофлуориметр CM 2203 (Solar, Беларусь). Измерения проводились с использованием кварцевых кювет толщиной 1 см. Длина волны возбуждения составляла 334 нм, а регистрация спектра люминесценции мономерной и эксимерной форм пирена проводилась в диапазоне 350–520 нм, шаг – 1 нм. В спектрах оценивались соотношения интенсивностей мономерной/эксимерной полосы пирена I₃₈₄/I₃₇₄ [13]. Размер структур, образующихся в растворах АОБ был определен методом динамического светорассеяния с помощью анализатора размера частиц Photocor Compact (ООО «Фотокор», Россия) с расчетом гидродинамического радиуса частиц (R).

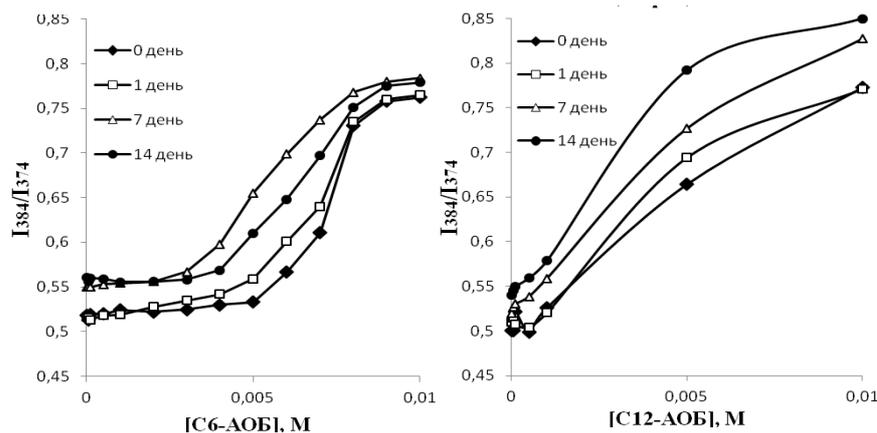


Рисунок 1. Изменение полярности окружения пирена в зависимости от концентрации АОБ

Подтверждением образования липосомоподобных структур в растворах АОБ являлось изменение соотношений I_{384}/I_{374} для C_6 -АОБ и C_{12} -АОБ (рис. 1) в зависимости от концентрации. Наличие S-образного участка кривых можно связать с образованием гидрофобных кластеров из молекул АОБ, в которые и устремляется пирен. Наблюдаемый же сдвиг в сторону уменьшения концентраций (с 5×10^{-3} М до 3×10^{-3} М), по нашему мнению, свидетельствует о постепенном формировании («созревании») липосомных структур в растворе.

Вышеизложенные результаты стали предпосылкой к проверке размеров образованных структур. Измерение динамического светорассеяния в растворах C_6 -АОБ позволило выделить три области концентраций, характеризующиеся присутствием структур преобладающих по своей объемной доле и типичным размерам (табл. 1).

На основании этого можно сделать вывод о наличии неустойчивых липосомальных структур в области низких концентраций. Характерный радиус частиц для области высоких концентраций составляет 156 ± 34 нм с повышением доли в образце до 100%, что свидетельствует о их стабильности. Укрупнение структур АОБ в растворе может быть объяснено их нахождением в виде многослойных липосом. Для растворов C_{12} -АОБ начиная с концентрации 10^{-4} М

Таблица 1. Зависимость размеров структур C_6 -АОБ в растворе от концентрации

Концентрация C_6 -АОБ, М	R, нм	Объемная доля в растворе, %
$< 5 \times 10^{-4}$	89 ± 12 378 ± 28	60 40
$10^{-3} - 5 \times 10^{-3}$	94 ± 11 250 ± 35	80 20
$6 \times 10^{-3} - 10^{-2}$	156 ± 34	100

абсолютно преобладали структуры с радиусом 164 ± 41 нм.

При определении влияния УЗ-обработки на процессы формирования липосомальных структур C_6 -АОБ концентрации 8×10^{-3} М оцененном на 14 день инкубации наблюдалось уменьшение размеров частиц до $R = 47 \pm 3$ нм, а при нагревание – до $R = 95 \pm 8$ нм. Растворы C_6 -АОБ без каких-либо воздействий позволяли сформировать стабильные липосомальные структуры с $R = 166 \pm 15$ нм.

Наиболее принципиальным результатом проведенного исследования представляется констатация образования липосомальных структур для C_6 -АОБ и C_{12} -АОБ. Подтверждена возможность инкапсулирования гидрофобного вещества в полученные системы. Определено воздействие факторов нагрева и озвучивания при получении липосомальных структур.

10.09.2013

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-97052 р_поволжье_a)

Список литературы:

- Ивонин А. Г., Пименов Е. В., Оборин В. А., Девришов Д. А., Копылов С. Н. Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы // Известия Коми НЦ УрО РАН. – 2012. – №9. – С.46-55.

2. Lasic D.D. Liposomes: From Physics to Applications. Chapter 10. Amsterdam: Elsevier Science B.V. 1993. – P. 493-516.
3. Ердякова, В.П. Теоретические и практические основы конструирования современных космецевтических средств, обладающих трансдермальной активностью: монография / В.П. Ердякова; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2008. – 326 с.
4. Atrooz O.M. Formation of Highly Antioxidative Liposomes from Crude Acetone Extracts of *Canna indica*, *Cucumis melo*, and *Prunus Armeniaca*//Asian Journal of Biochemistry. 2012.– №7(4). – P. 218-225.
5. Kozubek A., Tyman J. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-Isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity// Chemical Reviews. 1999.– V. 99. – №1. – P. 1-22.
6. Николаев Ю.А., Тарасов А.Л., Борзенков И.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Роль алкилоксибензолов в адаптации бактерий к неблагоприятным условиям роста//Микробиология. 2010.–Т.79.–№6.–С.760-766.
7. Nikolaev Yu.A., Borzenkov I.A., Kalinin M.V., Loiko N.G., Tarasov A.L., Plakunov V.K., Beliaev S.S., Voronina N.V., Galchenko V.F., El-Registan G.I. Antimicrobial features of phenolic lipids // Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 2010.–№46(2).–P.172-179.
8. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Эль-Регистан Г.И. Влияние химических аналогов микробных ауторегуляторов на чувствительность ДНК к УФ-облучению//Микробиология. 2006.–Т.75.–№5.–С. 654-661.
9. Дерябин Д.Г., Давыдова О.К., Грязева И.В., Эль-Регистан Г.И. Роль алкилоксибензолов в ответе *Escherichia coli* на летальное воздействие ультрафиолетового облучения//Микробиология. 2012.–Т. 81.–№2.–С.185-195.
10. Грязева И.В., Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Свиридова Т.Г., Свиридов А.П. Прогнозируемая и экспериментально выявляемая антиоксидантная активность алкилоксибензолов (алкилрезорцинов)//Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013.–№8.–С.41-46.
11. Stasiuk M., Kozubek A. Biological activity of phenolic lipids//Cell. Mol. Life Sci. 2010.–V. 67.–P.841-860.
12. Давыдова О.К., Никиян А.Н., Дерябин Д.Г. Формирование упорядоченных надмолекулярных структур ДНК в водных растворах в присутствии алкилрезорцинов//Вестник Оренбургского государственного университета. 2005.–№1.–С.174-177.
13. Kalyanasundaram K., Thomas J.K. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems//Journal of the American Chemical Society. 1977.–V. 99.–№7.–P.2039-2044.

Сведения об авторах:

Давыдова Ольга Константиновна, доцент кафедры микробиологии
Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук,
e-mail: okdavydova@yahoo.com

Гавриш Ирина Александровна, студент кафедры микробиологии
Оренбургского государственного университета,
e-mail: gavrish.irina.ogu@gmail.com

460018, Оренбург, пр. Победы 13, тел. (3532) 202023

UDC 547.537:54.052:57.088.5:57.021

Davydova O.K., Gavrish I.A.

Orenburg state university, e-mail: okdavydova@yahoo.com, gavrish.irina.ogu@gmail.com

CREATION OF LIPOSOMAL STRUCTURES ON THE BASIS OF ALKYLRESORCINOLS AND THEIR PROPERTIES INVESTIGATION

Possibility of receiving of liposomes from alkylresorcinols, distinguished by length of the alkyl radical is investigated. Concentration ranges of liposomal structures formation and their sizes are determined. Possibility of encapsulation of nonpolar substances in the received structures is confirmed; their stability at storage and under the influence of such factors as temperature and processing by ultrasound is also estimated.

Key words: alkylresorcinols, resorcinolic lipids, liposomes, pyrene.

Bibliography:

1. Ivonin A. G., Pimyenov E. V., Oborin V. A., Dyebrihev D. A., Kopilov C. N. The directional transport of drugs: actual state of question and prospects// Izvestiya Komi NC UrO RAN. 2012.–№9.–P.46-55.
2. Lasic D.D. Liposomes: From Physics to Applications. Chapter 10. Amsterdam: Elsevier Science B.V. 1993.–P.493-516.
3. Erdakova V.P. Theoretical and practical design principles of modern cosmeceutical having transdermal tivity of: monograph / V.P. Erdakova; Alt. State. tehn. University, BTL. – Bijsk: Publishing House of Alt. State. tehn. University Press, 2008.–326 p.
4. Atrooz O.M. Formation of Highly Antioxidative Liposomes from Crude Acetone Extracts of *Canna indica*, *Cucumis melo*, and *Prunus Armeniaca* // Asian Journal of Biochemistry. 2012.–№7(4).–P.218-225.
5. Kozubek A., Tyman J. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-Isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity // Chemical Reviews. 1999.–V.99.–№1.–P. 1-22.
6. Nikolaev JA, Tarasov AL, Borzenkov IA, Gal'chenko VF, El-Registan, GI Role alkiloksibenzolov bacteria to adapt to adverse growing conditions//Microbiology. 2010.–V. 79.–№6.–P.760-766.
7. Nikolaev Yu.A., Borzenkov I.A., Kalinin M.V., Loiko N.G., Tarasov A.L., Plakunov V.K., Beliaev S.S., Voronina N.V., Galchenko V.F., El-Registan G.I. Antimicrobial features of phenolic lipids//Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 2010.–№46(2).–P.172-179.
8. Davydova O.K., Deryabin D.G., El-Registan G.I. Influence of chemical analogues of microbial autoregulators on the sensitivity of DNA to UV radiation//Microbiology. 2006.–V.75.–№5.–P.568-574.
9. Deryabin D.G., Davydova O.K., Gryazeva I.V., El-Registan G.I. Role alkylhydroxybenzenes *Escherichia coli* in response to the lethal effects of ultraviolet irradiation//Microbiology.2012.–V.81.–№2.–P.185-195.
10. Gryazeva I.V., Davydova O.K., Deryabin D.G., Sviridova T.G., Sviridov A.P. Predicted and experimentally detectable antioxidant activity alkyloksibenzolov (alkylresorcinols)//Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2013.–№8.–P.41-46.
11. Stasiuk M., Kozubek A. Biological activity of phenolic lipids // Cell. Mol. Life Sci. 2010.–V.67.–P.841-860.
12. Davydova O.K., Nikiyan A.N., Deryabin D.G. Formation of ordered supramolecular structures of DNA in aqueous solution in the presence of alkylresorcinols//Bulletin of the Orenburg State University. 2005.–№1.–P.174-177.
13. Kalyanasundaram K., Thomas J.K. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems // Journal of the American Chemical Society. 1977.–V.99.–№7.–P.2039-2044.