

ПОИСК ЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА ВКЛЮЧЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКИ В СОСТАВ ЛИПОСОМ

О.А. Куликов

к.м.н. доцент, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва (г. Саранск)
E-mail: oleg-kulikov-84@mail.ru

В.П. Агеев

аспирант, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва (г. Саранск)

В.И. Инчина

д.м.н. профессор, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва (г. Саранск)

Представлено сравнение двух методов получения липосом с флуоресцентными свойствами; дано их описание. Проведены количественный анализ липосом с цианиновым красителем Cyanine-7, а также сравнение эффективности включения красителя в структуру липосом.

Ключевые слова: цианиновый краситель (Cy-7), флуоресценция, спектрофотометрия, липосомы.

Для цитирования: Куликов О.А., Агеев В.П., Инчина В.И. Поиск эффективного метода включения флуоресцентной метки в состав липосом. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(3):52-55.
DOI: 10.29296/25877313-2018-04-09

В настоящее время в биомедицинских исследованиях при проведении экспериментов *in vivo* и *ex vivo* широко пользуются цианиновыми красителями. Это могут быть конъюгаты препарата и красителя [1], а также меченые красителем частицы, такие как липосомы [2] или полимерные микрокапсулы [3]. Использование красителя позволяет визуализировать накопление исследуемой лекарственной субстанции или наночастиц в определенном органе или ткани [4]. Наиболее часто данный метод исследования применяется в экспериментальной онкологии [5]. Методика изготовления липосомальных везикул подробно описывается в научных работах, однако малое значение уделяется способу включения флуоресцентного агента в состав липосом.

Цель работы – сравнение эффективности двух методов включения флуоресцентного агента (красителя Cy-7) в состав липосомальных везикул.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использованы следующие материалы: цианиновый краситель Cyanine-7 (ООО «Биотех-Индустрия», Россия); ДМСО (диметилсульфоксид) (ООО «БИОТЭК», Россия); лецитин (фосфатидилхолин) EPCS 10 8018- 1/130 («Lipoid», Германия); холестерин, («Avanti Polar Lipids, Inc.», США); хлороформ (трихлорметан)

стабилизированный (х.ч.) («Химмед», Россия); вода очищенная деионизированная, ФС 42-2619-98; натрия хлорид Браун, р-р для инфузий 0,9%, 250 мл («Braun Melsungen», Германия).

Оборудование. Анализ проведен с помощью следующего оборудования: роторный испаритель Heidolph Laborota eco (Германия); экструдер LIPEX™ («Northern Lipids Inc.», Канада); анализатор размеров наночастиц NANO-flex («Microtrac Inc.», США); спектрофотометр UV-2600 («Shimadzu Inc.», Япония); камера для ультрафильтрации, модель 8200 («Amicon», США); диализный мешок MF-1210-76 с размером пор 12–14 кДа (MFPI, США); магнитная мешалка MS-3000 («Biosan», Латвия); шкаф сушильный вакуумный ULAB DZF-6020 (Китай).

Методы приготовления липосомальной дисперсии. В процессе изготовления липосом были использованы два метода включения цианинового красителя в состав липосомальной дисперсии. Для образования липидной плёнки в случае обоих методов навеску лецитина (300 мг) и холестерина (3 мг) помещали в круглодонную колбу вместимостью 1 л и добавляли хлороформ до полного растворения лецитина и холестерина. Процесс выпаривания хлороформа и образования липидной плёнки осуществляли под вакуумом при температуре 50 °С с постепенным увеличением количества оборотов вращения колбы с 30 до 150 об/мин.

Для изготовления липосом предварительно были приготовлены соответствующие растворы красителя Су-7 одинаковой концентрации – 125 мкг/мл.

Метод 1. Навеску (1 мг) красителя Су-7 растворяли в смеси ДМСО и воды (1:3), объём раствора – 8 мл. Затем 6-ю мл полученного раствора гидратировали липидную плёнку, образовавшуюся в колбе после выпаривания хлороформа.

Метод 2. Предварительно готовили раствор Су-7 в хлороформе (1 мг красителя на 8 мл хлороформа). После этого 6 мл приготовленного раствора Су-7 в хлороформе вносили в колбу с раствором холестерина и лецитина, т.е. до высушивания и образования липидной плёнки. Далее, как и в методе 1, производили выпаривание хлороформа. После образования липидной плёнки её гидратировали 6-ю мл физиологического раствора хлорида натрия.

Для получения липосомальных везикул как в методе 1, так и в методе 2 использовали экструзию через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 400 нм. Очистку липосомальной взвеси от свободного красителя в обоих методах осуществляли по одинаковой методике. Процесс очистки представлял собой ультрафильтрацию (диализ) через полупроницаемую мембрану с диаметром пор 12–14 кДа в атмосфере азота при давлении 0,3 МПа. Перед процедурой очистки 5 мл липосомальной взвеси, полученной при экструзии, доводили до 50 мл 25%-ным раствором ДМСО (для метода 1) и физиологическим раствором (для метода 2). Диализ длился 24 ч до образования густой очищенной липосомальной дисперсии. Объём диализата составлял 48 мл. Очищенные липосомы, полученные методом 1, доводили до объёма 5 мл 25%-ным раствором ДМСО. Липосомы, изготовленные методом 2, доводили до объёма 5 мл физиологическим раствором NaCl. Использование одинаковых растворов в каждом методе для всех этапов получения готовой липосомальной взвеси необходимо для избежания повреждения сформированных липосомальных везикул вследствие разности концентраций.

Определение размерных характеристик липосомальных наносфер проводили методом фотонной корреляционной спектроскопии. кривые распределения обрабатывали с помощью программы Microtrac Flex 11.0.0.2.

Метод количественного определения содержания красителя в липосомальной дисперсии. Для количественного определения содержания красителя в липосомальной дисперсии использовали спектрофотометрию. Предварительно был построен градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации раствора Су-7 (рис.1).

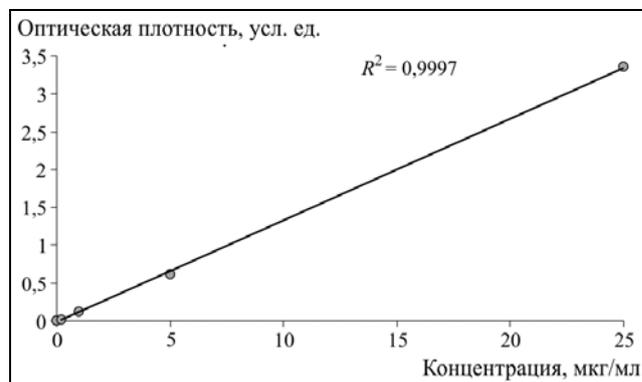


Рис. 1. График зависимости оптической плотности раствора Су-7 от концентрации

Для построения графика использовали растворы Су-7 в смеси ДМСО/вода с концентрацией красителя 0,2, 1, 5 и 25 мкг/мл. Оптическую плотность измеряли при $\lambda=760$ нм, что соответствует максимуму поглощения раствора Су-7 в смеси ДМСО/вода. Полученные результаты показали линейный характер зависимости оптической плотности раствора Су-7 от его концентрации в исследованном диапазоне с достаточным уровнем корреляции (рис. 1), что дает возможность использовать спектрофотометрию для определения содержания данного вещества в липосомах. Спектрофотометрии подвергали диализат, полученный при очистке липосом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После спектрофотометрии диализатов рассчитывали количество красителя в объёме диализата и очищенной липосомальной дисперсии. Данные спектрофотометрии и расчетные значения концентрации показаны в табл. 1 и 2.

Количество красителя в диализате вычисляли по формуле $X_1=C \times V_1$, где X_1 – количество Су-7 в диализате, мкг; V_1 – объём диализата, 48 мл; C – концентрация Су-7 в диализате, мкг/мл.

Таблица 1. Результаты спектрофотометрии диализатов

№ опыта	Метод 1		Метод 2	
	С _д , мкг/мл	D _д	С _д , мкг/мл	D _д
1	1,8250	0,1997	0,1503	0,0012
2	1,8214	0,1993	0,1458	0,0006
3	1,8204	0,1992	0,1473	0,0008
4	1,8223	0,1994	0,1496	0,0011
5	1,8269	0,1999	0,1480	0,0009
M	1,8232	0,1995	0,1482	0,00092
S	0,002684	–	0,001801	–
ΔX _{ср}	0,00334	–	0,00224	–

Примечание: С_д – концентрация красителя в диализате; D_д – оптическая плотность диализата; M – среднее; S – среднее квадратическое отклонение; ΔX_{ср} – доверительный интервал.

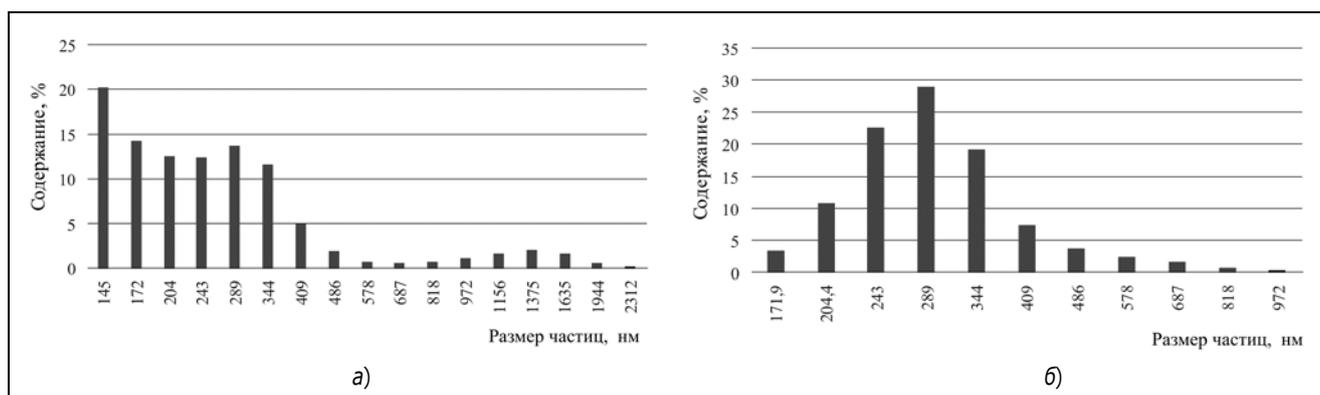


Рис. 2. Распределение липосом, полученных методом 1 (а) и методом 2 (б) по диаметру (показатели наносайзера NANO-flex)

Таблица 2. Результаты количественного определения содержания красителя Су-7 в липосомах

Показатель	Метод 1	Метод 2
X ₁ , мкг	87,514±0,0033	7,114±0,00224
X ₂ , мкг	537,486±0,0033	617,886±0,00224
С _л , мкг/мл	107,497 ±0,0007	123,577±0,000448
E, %	85,99±0,00056	98,86±0,00039
F	0,003225	0,002471

Примечание: С_л – концентрация красителя в липосомальной дисперсии; E – эффективность включения красителя в липосомы; F – отношение красителя к лецитину готовых липосом.

Количество красителя, оставшееся в липосомах, находили по формуле $X_2 = 125 \text{ мкг/мл} \cdot V_2 - X_1$, где X₂ – количество Су-7 в очищенном объеме липосом; V₂ – объем очищенной липосомальной взвеси, 5 мл. Полученные значения использовали для расчета концентрации красителя в очищенных липосомах, эффективности включения Су-7 в липо-

сомальные везикулы, а также соотношения красителя и лецитина в составе липосом (табл. 2).

Концентрацию красителя в очищенных липосомах рассчитывали по формуле:

$$C_l = X_2 / V_2;$$

эффективности включения Су-7 в липосомальные везикулы:

$$E = (C_l / 125 \text{ мкг/мл}) \times 100\%,$$

где 125 мкг/мл – это исходная концентрация красителя при загрузке реакционной смеси в колбу роторного испарителя.

Отношение количества красителя к лецитину готовых липосом рассчитывали по формуле:

$$F = (C_l \times 6 \text{ мл}) / M_{\text{лец}},$$

где 6 мл – это изначальный объем реакционной смеси; M_{лец} – масса лецитина в изначальном объеме реакционной смеси.

Результат измерения размеров липосомальных наносфер: липосомы, полученные методом 1, имели средний размер 342±32 нм в диаметре, полученные методом 2 – 313±2 нм (рис. 2).

ВЫВОДЫ

1. При изготовлении липосомальных везикул, меченых флуоресцентным красителем Cy-7, более приемлемым следует считать метод 2, где краситель вводился в состав липидной плёнки до образования везикул. Такой способ приготовления позволяет наиболее полно расходовать краситель, так как эффективность включения при этом методе более высокая и приближается к 100 %.
2. Преимущество метода 2 заключается в учтённых физических свойствах красителя, т.е. его лёгкой растворимости в неполярных растворителях. Будучи полностью растворённым в хлороформе, он более легко смешивается с липидами и, следовательно, становится частью билипидного слоя липосомальных везикул. Липосомы, полученные методом 2, имели размерные характеристики, более приближенные к стандартным, в отличие от приготовленных методом 1.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ma P., Yu H., Zhang X. *et al.* Increased Active Tumor Targeting by An $\alpha\beta 3$ -Targeting and Cell-Penetrating Bifunctional Peptide-Mediated Dendrimer-Based Conjugate // *Pharm Res.* 2017. V. 34. № 1. P. 121–135.
2. Yu Y., Wang Zhao-H., Zhang L. *et al.* Mitochondrial targeting topotecan-loaded liposomes for treating drug-resistant breast cancer and inhibiting invasive metastases of melanoma // *Biomaterials.* 2012. № 33. P. 1808–1820.
3. Kilic E., Lim Su-H., Kulikov O. *et al.* Formulation for Oral Delivery of Lactoferrin Based on Bovine Serum Albumin and Tannic Acid Multilayer Microcapsules // *Scientific Reports.* 7:44159. DOI: 10.1038/srep44159.
4. Chena Liang-C., Changa Chih-H., Yua Chia-Y. *et al.* Pharmacokinetics, micro-SPECT/CT imaging and therapeutic efficacy of ^{188}Re -DXR-liposome in C26 colon carcinoma ascites mice model // *Nuclear Medicine and Biology.* 2008. № 35. P. 883–93.
5. Zou A., Chen Y., Huo M. *In vivo* Studies of Octreotide-Modified N-Octyl-O,N-Carboxymethyl Chitosan Micelles Loaded with Doxorubicin for Tumor-Targeted Delivery // *J. of Pharmaceutical sciences.* 2013. V. 102. № 1. P. 126–35.

Поступила после доработки 8 октября 2017 г.

THE SEARCH FOR AN EFFECTIVE METHOD OF INCORPORATING A FLUORESCENT LABEL INTO LIPOSOMES COMPOSITION

© Authors, 2018

O.A. Kulikov

Ph.D. (Med.), Associate Professor, National Research Ogarev Mordovia State University (Saransk)

E-mail: oleg-kulikov-84@mail.ru

V.P. Ageev

Post-graduate Student, National Research Ogarev Mordovia State University (Saransk)

V.I. Inchina

Dr.Sc. (Med.), Professor, National Research Ogarev Mordovia State University (Saransk)

Objective. Determine the most effective method of incorporating a fluorescent dye into the composition of liposomal vesicles. **Materials.** Cyanine dye (Cy-7); Dimethylsulfoxide; Lecithin (phosphatidylcholine); Cholesterol; Chloroform; Purified deionized water; Sodium chloride. **Equipment.** Rotary evaporator; Extruder; Nanoparticle size analyzer; Spectrophotometer; Dialysis chamber; Dialysis bag; Magnetic stirrer with heating; Vacuum oven. **Method for obtaining a liposomal dispersion with a dye Cyanine-7.** Liposomes were obtained by reversing the phases from lecithin and cholesterol. The dye was included in the composition of liposomal vesicles by two different methods. **Method 1** was that the lipid film after drying was hydrated with a solution of the Cy-7 dye. The dye was dissolved in a mixture of dimethylsulfoxide and water in a ratio of 1:4. **Method 2** was that before during the formation of the lipid film, a solution of the Cy-7 dye in chloroform was added, and then drying took place. After drying, the lipid film containing the dye was hydrated with physiological sodium chloride solution. The concentration of the dye in the solutions of both methods was 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In both methods, the process for obtaining liposome vesicles was extrusion using a polycarbonate filter with a pore diameter of 400 nm. The size of the liposomes was determined using a nanoparticle analyzer. The average diameter of the liposomes was 342 ± 32 nm for method 1 and 313 ± 2 nm for method 2. Purification of liposomes from free dye was performed by dialysis through a membrane with a pore diameter of 12–14 kDa under a nitrogen pressure of 0.3 MPa. Spectrophotometry was used to quantify the content of Cy-7 in liposomes. The dialysate obtained in the purification of liposomes was subjected to spectrophotometry. The optical density of the dialysate containing the dye not included in the liposomes was measured at $\lambda = 760$ nm. The concentration of the dye in the dialysate was found by the calibration schedule. To construct the calibration schedule, samples of solutions with different concentrations of the fluorescent dye were used. The effectiveness of the inclusion of the dye Cy-7 in liposomes using method 1 was 86%, using method 2–99%. The ratio of the dye to the lecithin of the purified liposomes was 0.003 and 0.0025, respectively. **Conclusion.** Thus, using the second method for preparing liposomes, the dye incorporation efficiency is higher and the dimensions of the liposomal vesicles are more uniform.

Keywords: cyanine dye (Cy-7), fluorescence, spectrophotometry, liposomes.

For citation: Kulikov O.A., Ageev V.P., Inchina V.I. The search for an effective method of incorporating a fluorescent label into liposomes composition. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2018;21(2):52–55. DOI: 10.29296/25877313-2018-04-09