



УДК 577.112.3.087:616.858-008.6

## КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ДОПАМИНА В ЛИПОСОМАХ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСМЕМБРАННОГО ГРАДИЕНТА КОНЦЕНТРАЦИИ СУЛЬФАТА АММОНИЯ

© 1999 г. И. В. Жигальцев, С. Н. Коломейчук,  
А. П. Каплун<sup>#</sup>, В. Г. Кучеряну\*, В. В. Юрасов\*, В. И. Швец

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,  
117571, Москва, пр. Вернадского, 86;

\* НИИ общей патологии и патологической физиологии РАМН

Поступила в редакцию 13.07.98 г. Принята к печати 18.09.98 г.

Исследовано концентрирование с помощью градиента концентрации сульфата аммония допамина в липосомах, состоящих из яичного фосфатидилхолина и холестерина. Показано, что применение данного метода позволяет загрузить в моноламеллярные липосомы до 90% от исходного количества допамина и таким образом значительно увеличить соотношение допамин/липиды. Полученные липосомы с допамином, содержащие токоферол в составе липидного бислоя, стабильны в течение 3 недель.

*Ключевые слова:* допамин; липосомы; концентрирование в липосомах; сульфат аммония; токоферол; перекисное окисление липидов.

Первые попытки использования ионного градиента в качестве движущей силы концентрирования слабых органических кислот и оснований в липосомах были предприняты более двадцати лет назад [1]. Однако число работ по данной тематике, опубликованных к настоящему времени, невелико [1–7]. Ряд причин, сдерживающих прогресс в данной области, связан с использованием ионного транспорта, основанного на применении градиента рН как наиболее распространенного способа. Как правило, градиент рН нестабилен во времени, что приводит к высвобождению содержимого везикул в течение нескольких часов и даже минут [4]. Кроме того, градиент рН не подходит для концентрирования веществ, нестабильных в щелочных или кислотных средах.

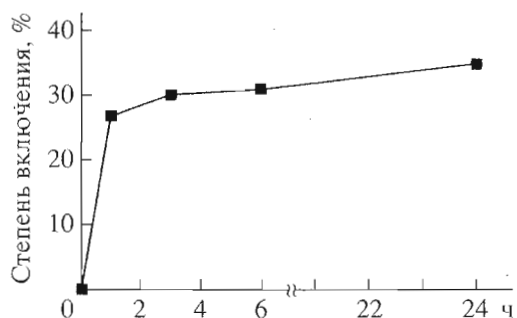
Возможность преодоления указанных недостатков видится в использовании ионных градиентов, альтернативных протонному. В частности, стабильные ионные градиенты могут быть созданы с помощью неорганических солей аммония. В этом случае градиент концентрации соли между двумя водными компартментами липосомной дисперсии, разделенными липидным бислоем, (внутри и вне липосом) образуется при удалении соли из внешней среды. С использованием градиента сульфата и хлорида аммония был проведен

ряд успешных работ по загрузке липосом слабыми амфифильными основаниями, такими как доксорубин и другие антрациклины [8–10]. При этом было показано, что ионный градиент, создаваемый сульфатом аммония, стабилен во времени, не требует изменения рН внешней среды, а также подходит для липосом различного состава и независим от метода их получения [9]. Таким образом, удачное сочетание высокой эффективности загрузки и использования щадящих значений рН позволяют нам рассматривать данный подход как наиболее перспективный для получения липосомных препаратов с допамином в качестве действующего компонента. При этом в качестве носителя могут быть использованы малые одноламеллярные липосомы, размер которых позволяет осуществлять их внутривенное введение. Ранее нами было показано, что малые одноламеллярные липосомы, нагруженные допамином, представляют собой потенциальную лекарственную форму для фармакотерапии паркинсонического синдрома [11, 12]. Настоящая работа посвящена изучению возможностей применения градиента сульфата аммония для концентрирования допамина в липосомах.

В первой части работы мы сравнили различные способы удаления соли из внешней среды. Были использованы малые одноламеллярные липосомы, полученные в 120 мМ растворе сульфата аммония методом озвучивания дисперсии мультисламеллярных липосом, состоящих из смеси яичного фосфатидилхолина и холестерина в моль-

Сокращения: Chol – холестерин; ePC – яичный фосфатидилхолин; SDC – дезоксихолат натрия; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ЭДС – электродвижущая сила.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



**Рис. 1.** Кинетика загрузки липосом допамином. Концентрация липидов 20 мг/мл, концентрация допамина 1 мг/мл, начальное соотношение допамин/липиды 106 ммоль/моль, исходная концентрация сульфата аммония 120 мМ.

ном соотношении 7 : 3. Гель-фильтрация для отделения невключившегося сульфата аммония и создания трансмембранного градиента концентрации, с нашей точки зрения, менее целесообразна ввиду значительного (в 40 раз) разбавления при этом исходной липосомной дисперсии. Наилучший результат был получен при отделении невключившегося в липосомы сульфата аммония путем 2-кратного диализа против 10% раствора сахарозы в течение 1 сут. Полученный градиент концентрации сульфата аммония во вне- и внутрилипосомном пространствах характеризуется разностью концентраций ионов аммония внутри и вне липосом. Очевидно, что эффективность загрузки прямо зависит от величины этого градиента. Концентрацию  $\text{NH}_4^+$  измеряли с помощью  $\text{NH}_4^+$ -селективного электрода в двух пробах диализного раствора после 10 и 24 ч диализа, для чего предварительно строили калибровочную кривую с использованием стандартных растворов  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (100 – 0.1 мМ).

Было показано, что после 2-кратного диализа в течение 10 ч и 1 сут концентрация катионов аммония в диализной среде составила 1.2 и 0.18 мМ соответственно. При условии, что внутрилипосомная концентрация  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  остается равной исходной (120 мМ), внутрилипосомная концентрация  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  более чем в 600 раз превышает наружную.

Во второй части работы было изучено влияние исходных концентраций липидов и допамина на степень включения последнего в липосомы. После диализа в липосомной дисперсии растворяли гидрохлорид допамина, а также метабисульфит натрия – с целью замедления окисления допамина. Степень включения допамина в липосомы (отношение количества допамина, включившегося в липосомы, к общему количеству внесенного допамина) определяли путем отделения невключившегося допамина гель-фильтрацией. Наиболее

быстрая фаза загрузки допамина наблюдалась в течение первого часа инкубации (см. рис. 1). Достигнутая при этом степень включения допамина не изменялась в течение 2 недель после завершения загрузки.

Ранее нами было показано [13], что допамин, включенный в липосомы в виде раствора с концентрацией 2.5 мг/мл, уменьшает скорость окисления ePC почти в 5 раз. При этом допамин, находящийся внутри липосом, в значительной степени защищен от окисления за счет барьерной функции липидного бислоя. Однако в липосомах, загруженных допамином с помощью градиента сульфата аммония до более высоких концентраций внутри липосом (10–20 мг/мл) (внутрилипосомная концентрация допамина рассчитывалась, исходя из соотношения внутреннего и внешнего объемов дисперсии и количества допамина в липосомах), было отмечено значительное увеличение уровня ПОЛ. Продукты ПОЛ дестабилизируют липосомы, делают их более проницаемыми, поэтому для стабилизации уровня ПОЛ необходимо введение в липидный бислой эффективного антиоксиданта. В качестве такового опробовали  $\alpha$ -токоферол. Было обнаружено, что в нагруженных допамином липосомах с содержанием  $\alpha$ -токоферола 0.005, 0.01 и 0.05 моль/моль липидов уровень продуктов ПОЛ снижается на 15, 30 и 40% соответственно (за 100 % принимали уровень ПОЛ в липосомах без  $\alpha$ -токоферола). Кроме того, в присутствии  $\alpha$ -токоферола в липидном бислое содержание продуктов ПОЛ сохранялось на исходном уровне в течение по крайней мере 3 недель. Также было отмечено, что внутрилипосомный допамин в присутствии  $\alpha$ -токоферола стабилен в течение 2 недель, в то время как в отсутствие антиоксиданта окисленные формы допамина были обнаружены спектрофотометрически по поглощению при 390 нм [13] спустя 48 ч после приготовления липосом. При этом не было отмечено изменения соотношения допамин/липиды по сравнению с контрольными образцами, не содержащими  $\alpha$ -токоферол. Таким образом, присутствие в липидном бислое  $\alpha$ -токоферола в указанных соотношениях не приводит к заметному изменению проницаемости бислоя для допамина.

Как и следовало ожидать (см. результаты, представленные в таблице), с увеличением исходного отношения допамин/липиды возрастает отношение внутрилипосомный допамин/липиды. Также вполне очевидно, что эффективность загрузки допамина в липосомы прямо зависит от соотношения объемов внутри и вне липосом. С увеличением концентрации липидов, и, следовательно, общего водного объема липосом степень включения допамина в липосомы последовательно возрастала. Однако в то же время с увеличением концентрации липидов соотношение внутрилипосомный допамин/носитель снижалось. Для

Характеристика полученных липосом

Концентрация липидов, мг/мл	Соотношение допамин/липиды начальное, ммоль/моль	Концентрация допамина, мг/мл	Степень** включения допамина, %	Соотношение внутрилипосомный допамин/липиды, ммоль/моль
50*	214	2.5	5	10
20	107	0.5	49	53
20	214	1	37	79
50	43	0.5	66	28
50	85	1	52	44
100	21	0.5	87	19

\* Липосомы, полученные без применения градиентного метода.

\*\* Отношение количества допамина, включившегося в липосомы, к общему количеству внесенного допамина.

нагруженных активным веществом липосом, представляющих собой потенциальную лекарственную форму, желательно достичь как можно большего соотношения активное вещество/носитель. Степень включения, как экономический показатель, имеет второстепенное значение. Таким образом, исходные концентрации допамина и липидов должны подбираться так, чтобы достичь максимальной концентрации внутрилипосомного допамина несмотря на некоторое снижение эффективности включения.

Кроме того, степень включения веществ в липосомы при использовании градиента значительно повышается при образовании нерастворимых солей загружаемого вещества во внутреннем объеме липосом, так как в этом случае вход дополнительных его количеств в липосомы не увеличивает его концентрацию. Это было показано для липосомных препаратов доксорубина [8]. В случае сульфата допамина не удалось получить насыщенный раствор во внутреннем объеме липосом при данных условиях загрузки. Тем не менее, использованная методика позволяет достичь почти 90% эффективности загрузки допамина в липосомы при исходном соотношении допамин/липиды, равном 21 ммоль/моль (таблица).

В литературе [9] приводится следующее объяснение механизма загрузки липосом с помощью градиента сульфата аммония. Действующая сила градиента  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (реакция диссоциации представлена уравнением (1), рис. 2) обусловлена значительной разницей в коэффициентах проницаемости через липидный бислой ( $P$ ) для различных соединений и ионов:  $P_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} < P_{\text{SO}_4^{2-}} < P_{\text{NH}_4^+} \ll P_{\text{H}^+} \ll P_{\text{NH}_3}$ . Очень высокий коэффициент проницаемости для молекулы аммиака ( $P \sim 0.13$  см/с) [14] приводит к быстрой диффузии нейтральных молекул  $\text{NH}_3$ , образующихся при протолизе катионов аммония во внутрилипосомном пространстве (рис. 2, уравнение (2)). Для сферических везикул с радиусом  $r$  время, за которое молекула пре-

одолеет  $1/2$  толщины липидного бислоя, определяется соотношением:  $t_{1/2} = \ln 2 \times r/3P$ . При  $r = 100$  нм  $t_{1/2}(\text{NH}_3) = 0.2 \times 10^{-4}$  с, в то время как для катиона аммония эта величина больше на три порядка. Быстрая диффузия аммиака из липосом по градиенту концентрации (в начальный момент концентрация  $\text{NH}_3$  вне липосом пренебрежимо мала) сдвигает равновесие реакции 2 вправо, т.е. в сторону понижения pH во внутреннем объеме липосом. В свою очередь катехоламины в нейтральной форме способны проникать через бислой, однако, приобретая положительный заряд в

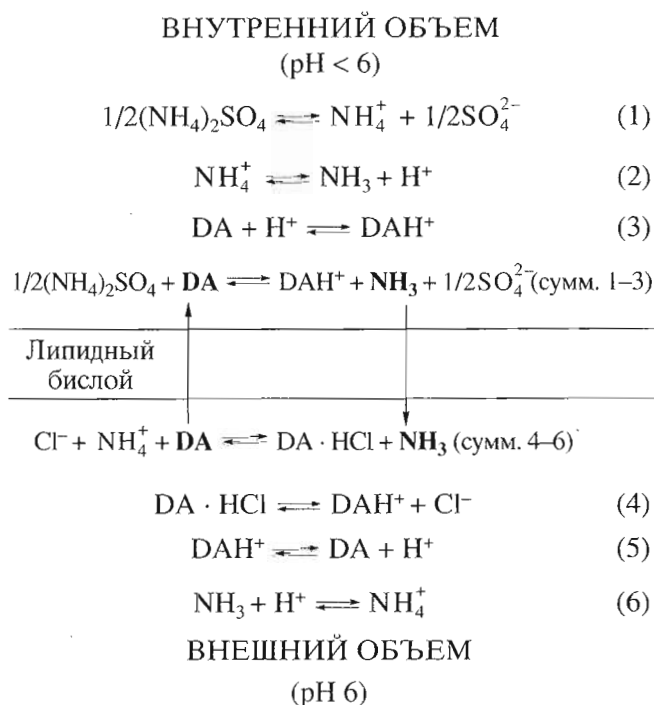


Рис. 2. Схема загрузки липосом допамином с помощью трансмембранного градиента концентрации сульфата аммония (DA – допамин,  $\text{DAH}^+$  – протонированный допамин).

кислой среде внутреннего объема липосом, они почти полностью теряют эту способность, так как коэффициент проницаемости для заряженной молекулы значительно меньше, чем для незаряженной (рис. 2, уравнения (3)–(6)). Скорость входа допамина будет выше скорости выхода до тех пор, пока концентрации незаряженного допамина внутри и вне липосом не сравняются.

Таким образом, аккумуляция активного вещества объясняется перераспределением протонированных и нейтральных форм катехоламинов между внешней средой и внутренним объемом липосом. Эффективная загрузка липосом возможна только в том случае, когда значение коэффициента проницаемости для нейтральных молекул достаточно велико ( $P > 10^{-4}$  см/с) [14].

Соотношение концентраций протонированных форм катехоламинов во внутри- и внелипосомных пространствах определяется уравнением Хендерсона–Хассельбаха:

$$[\text{АН}^+]_{\text{in}}/[\text{АН}^+]_{\text{out}} = [\text{Н}^+]_{\text{in}}/[\text{Н}^+]_{\text{out}} \sim C_{\text{in}}/C_{\text{out}},$$

где  $[\text{АН}^+]$  – концентрация протонированного катехоламина,  $[\text{Н}^+]$  – концентрация протонов,  $C$  – общая концентрация катехоламина. Логарифмируя это уравнение, получаем

$$\text{pH}_{\text{out}} - \text{pH}_{\text{in}} = \lg([\text{АН}^+]_{\text{in}}/[\text{АН}^+]_{\text{out}}),$$

т.е. перераспределение протонированных форм катехоламинов и, следовательно, эффективность загрузки определяется значением pH во внутрелипосомном пространстве. Например, при  $\text{pH}_{\text{out}} - \text{pH}_{\text{in}} = 3$  создаются предпосылки для достижения внутри липосом в 1000 раз большей концентрации активного вещества, чем во внешней среде. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при использовании градиента концентрации сульфата аммония внутрелипосомная концентрация допамина в 10–20 раз превышает внешнюю, что соответствует  $\Delta\text{pH} \sim 1$ . Таким образом, нам удалось показать, что предлагаемая методика позволяет получать липосомные препараты допамина с высоким содержанием активного вещества, удерживаемого внутри липосом в течение длительного времени.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-2Т (СССР) с частотой 22 кГц, спектрофотометр Beckman DU-6 (Beckman, США), иономер универсальный ЭВ-74 (СССР),  $\text{NH}_4^+$ -ионоселективный электрод ЭИ-12 (СССР), хлорсеребряный электрод сравнения ЭВЛ-1М33.1 (СССР), диализные мешки Serva (ФРГ). Chol, допамин, SDC (Serva, ФРГ); D,L- $\alpha$ -токоферол, сахарозу, метабисульфит натрия (Merck, ФРГ); NaCl, KCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Химмед, Рос-

сия); ePC (Биолек, Украина) применяли без дополнительной очистки.

**Получение липосом с допamiном.** Раствор ePC и Chol в соотношении 7 : 3 (моль/моль) в хлороформе упаривали в круглодонной колбе до постоянного веса, после чего липидную пленку диспергировали в 120 мМ растворе сульфата аммония и получали дисперсии с конечной концентрацией липидов 20, 50 и 100 мг/мл. Мультиламеллярные липосомы подвергали ультразвуковой обработке в течение 5 мин при охлаждении льдом; отношение времени озвучивания ко времени релаксации 30 с/30 с. Сульфат аммония отделяли диализом (объем в мешке 3 мл) в течение 1 сут против 10% раствора сахарозы объемом  $2 \times 250$  мл. Затем в липосомную дисперсию объемом 2 мл вносили допамин (1 или 2 мг), 1 мг метабисульфита натрия и инкубировали при  $4^\circ\text{C}$  в течение 24 ч.

Суспензию нагруженных липосом (0.1 мл) наносили на колонку с 15 мл сефадекса G-50 в физиологическом растворе и элюировали тем же раствором со скоростью 2 мл/мин. Собирали две фракции, поглощающие при 280 нм. С целью изучения удерживающей способности липосом повторные элюции проб проводили в течение двух недель через каждые 2 сут.

Концентрацию допамина в липосомах и степень включения в них вещества рассчитывали по данным измерения оптического поглощения при 280 нм после добавления к 2 мл фракций по 0.1 мл 5.4% раствора SDC. Расчетная формула включения допамина в липосомы (%):  $D1 \times V1 \times 100 / (D1 \times V1 + D2 \times V2)$ , где  $D1$  и  $D2$  – оптическое поглощение фракции липосом после добавления SDC и фракции неключившегося допамина после добавления SDC,  $V1$  и  $V2$  – суммарный объем фракции липосом и фракции неключившегося допамина.

**Определение концентрации катионов аммония в диализной среде.** Концентрацию катионов аммония в диализной среде определяли, измеряя потенциал раствора с помощью  $\text{NH}_4^+$ -селективного электрода, предварительно построив калибровочный график в координатах ЭДС (мВ) =  $f(-\lg[\text{NH}_4^+])$ . Для построения калибровочного графика использовали растворы сульфата аммония объемом 50 мл с концентрациями 100, 10, 1 и 0.1 мМ в 10% растворе сахарозы.

**Динамика накопления продуктов ПОЛ в липосомах с допamiном.** Липосомы хранили при  $4^\circ\text{C}$ . Перед отбором проб дисперсии встряхивали. К 0.2 мл суспензии липосом добавляли EDTA до конечной концентрации 1 мМ, 1.3 мл 25% раствора трихлоруксусной кислоты и 1.5 мл 0.5% раствора тиобарбитуровой кислоты. После инкубирования проб в течение 10 мин на кипящей водяной бане определяли оптическое поглощение растворов при 532 и 580 нм. Для учета неспецифи-

ческого поглощения в области длинноволновой границы поглощения комплекса тиобарбитуровой кислоты с малоновым альдегидом использовали показатель  $\Delta A = A_{532} - A_{580}$ .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deamer D.W., Prince R.C., Crofts A.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1972. V. 274. P. 323–335.
2. Nichols J.W., Deamer D.W. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1976. V. 455. P. 269–271.
3. Marcel B.B., Mayer L.D., Loughrey H., Redelmeier T., Madden T., Wong K., Harrigan P.R., Hope M. J. // *Chem. Phys. Lip.* 1988. V. 47. P. 97–107.
4. Madden T.D., Harrigan P.R., Tai L.C.L., Bally M.B., Mayer L.D., Redelmeier T., Loughrey H., Tilcock C. P.S., Reinish L.W., Cullis P.R. // *Chem. Phys. Lip.* 1990. V. 53. P. 37–46.
5. Mayhew E., Lasic D.D., Babbar S., Martin F.J. // *Int. J. Cancer.* 1992. V. 52. P. 302–309.
6. Harrigan P.R., Wong K.F., Redelmeier T., Wheeler J.J., Cullis P.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1149. P. 329–338.
7. Chakrabarti A.C., Clark-Lewis I., Cullis P.R. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 8479–8485.
8. Cohen R., Haran G., Bar L.K., Barenholz Y. // 15th Int. Cong. Biochem. Abstracts. Sweden, Göthburg, Aug. 12–14. 1991. P. 97.
9. Haran G., Cohen R., Bar L.K., Barenholz Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1151. P. 201–215.
10. Lasic D.D., Frederick P.M., Stuart M., Barenholz Y., McIntosh T.J. // *FEBS Lett.* 1992. V. 312. P. 255–258.
11. Kucheryanu V. G., Zhigaltsev I.V., Yurasov V.V., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Kaplun A.P., Shvets V.I. // *J. Liposome Research.* 1998. V. 8. P. 73.
12. Yurasov V.V., Kucheryanu V.G., Kaplun A.P., Zhigaltsev I.V., Nikushkin E.V., Shvets V.I., Kryzhanovsky G.N. // *The 24th Intern. Symp. on Controlled Release of Bioactive Materials. Proceedings.* Stockholm, June 15–19. 1997. P. 477–478.
13. Борисова Н.В., Жигальцев И.В., Богомолов О.В., Каплун А.П., Юрасов В.В., Кучеряну В.Г., Никушкин Е.В., Кръжановский Г.Н., Швец В.И. // *Биоорг. химия.* 1997. Т. 23. С. 284–289.
14. Stephane C., Barenholz Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1240. P. 257–265.

**An Active Liposome Loading with Dopamine by a Transmembrane Gradient of Ammonium Sulfate**

**I. V. Zhigaltsev\*, S. N. Kolomeitchuk\*, A. P. Kaplun\*\*,  
V. G. Kucheryanu\*\*, V. V. Yurasov\*\*, and V. I. Shvets\***

\*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

\*\*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

The active loading of liposomes from egg phosphatidylcholine and cholesterol with dopamine using an ammonium sulfate gradient was studied. Our conditions allowed the enrichment of the monolamellar liposomes with 90% dopamine added to the medium and, thus, considerably improve the dopamine/lipid ratio. Dopamine-containing liposomes with tocopherol in their lipid bilayer were shown to be stable for 3 weeks.

*Key words:* active liposome loading, ammonium sulfate, dopamine, liposomes, lipid peroxidation, tocopherol

# To whom correspondence should be addressed.