

МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ МЕМБРАННОГО ТРАНСПОРТА

**Никифорова В.С., Зимин А.А., Якимов А.С., Лукьяненко К.А.,
научный руководитель д-р физ.-мат. наук Белобров П.И.
*Сибирский федеральный университет***

Транспортные свойства биологических мембран играют важную роль в формировании каналов межклеточной коммуникации, таких как плазмодесмы, щелевые контакты и септальные поры [1]. Мембранный транспорт – нетривиальный процесс, требующий рассмотрения не только с биологических, но и с физико-химических позиций. Динамика мембраны описывается целостно только при комбинировании биологического, физического и химического подходов. Детальное понимание процессов мембранного транспорта имеет непосредственное прикладное значение в медицинских применениях, а также важно с фундаментальных биофизических позиций. Подойти к пониманию принципов, регулирующих мембранный транспорт и межклеточные коммуникации, можно с помощью моделирования структурных и динамических аспектов биологических мембран на примере липосом – двухфазных систем, содержащих водный раствор, заключенный в билипидный слой, который окружен снаружи объемной водной фазой.

В настоящее время липосомы являются прототипом практически любых наноразмерных транспортных конструкций, находя применение в фармацевтических и биомедицинских отраслях. Применение липосом включает себя моделирование широкой группы биологических процессов, включая изучение транспорта и метаболизма лекарств, клеточных осмосенсоров, механочувствительных ионных каналов, транспорта аминокислот и взаимодействия растворимых белков с клеточными мембранами, и многих других задач [2]. Таким образом, липосомы представляют собой гибкую модельную систему, позволяющую решать ряд прикладных медицинских и биофизических вопросов. Целью настоящей работы является отработка методики получения липосом на основе олеиновой кислоты.

Выбор олеиновой кислоты обусловлен её химическими свойствами. Олеиновая кислота является слабой жирной кислотой с длинным алифатическим хвостом, электронодонорные свойства которого резко снижают полярность карбоксильной группы, что делает олеиновую кислоту слабой: в нейтральной и кислой среде она находится в практически недиссоциированной форме и не растворяется в воде. В сильнощелочной среде, однако, происходит диссоциация олеиновой кислоты с образованием олеат-аниона, который представляет собой водорастворимое поверхностно-активное вещество (ПАВ). Таким образом, при повышении pH среды можно полностью избавиться от жировой компоненты липосом, высвободив их содержимое наружу. Наоборот, понижение pH приводит к образованию эмульсии олеиновой кислоты.

Методика получения липосом в настоящей работе базируется на простых физико-химических принципах. Жировая фаза сначала подвергается лиофилизации с помощью амфифильного растворителя с примесью ПАВ с образованием гомогенной системы, растворимость жира в которой зависит от соотношения между водой и амфифильным растворителем. Разбавление полученной системы большим объемом чистой воды или раствора наполнителя приводит к резкому снижению растворимости жира, который за счет присутствия в системе ПАВ образует многослойные полидисперсные липосомы, содержащие внутри введенную водную фазу. Дальнейшая обработка системы

ультразвуком выравнивает распределение липосом по размерам и числу слоев, приводят к образованию преимущественно однослойных липосом в сравнительно узком интервале размеров.

Материалы, используемые в настоящей работе, включали в себя вещества:

1. Основной компонент липосом: Олеиновая кислота, чда.
2. Лиофилизирующий агент: Изопропиловый спирт, чда.
3. ПАВ: Tween 80 P4780 (Sigma-Aldrich, USA)
4. Краситель: Толуидиновый синий, ИМП

Оборудование, используемое в настоящей работе:

1. Ультразвуковой гомогенизатор Bandelin Sonoplus HD3400 с зондом MS73
2. Микроскоп оптический Carl Zeiss Axio Scope.A1

Методика проведения работы включает в себя два подготовительных этапа. На первом этапе осуществляется непосредственное приготовление липосом. Для этого 50 мкл олеиновой кислоты смешивают в пенициллиновом флаконе HC3 ФО-10 со 100 мкл изопропилового спирта и желаемым объемом неразведенного Tween 80. Объем Tween 80 определяют исходя из ожидаемого размера липосом: 20 мкл достаточно для образования липосом с размерами меньше 1 мкм, в то время как 5 мкл Tween 80 ведут к устойчивому размеру липосом в интервале 3..7 мкм. Tween 80 необходим также и для стабилизации липосом, поскольку несмотря на поверхностно-активные свойства изопропилового спирта по отношению к водно-жировым средам, его эмульгирующие способности недостаточны для формирования устойчивой коллоидной системы.

После перемешивания получается прозрачная и однородная жидкость, легко стекающая по стенкам флакона. Затем в полученную однофазную смесь вливают 1 мл дистиллированной воды либо водного раствора красителя, что приводит к образованию липосом с капсулированной в них водной фазой. Полученные липосомы придают системе характерный белый «молочный» оттенок, если не был использован краситель. При использовании красителя смесь приобретает его цвет.

На втором этапе липосомы подвергают ультразвуковой обработке в непрерывном режиме в течение 1 минуты на 10% мощности с зондом MS73. Микрофотографии липосом, сделанные сразу после приготовления и после ультразвуковой обработки, представлены на рисунке 1.

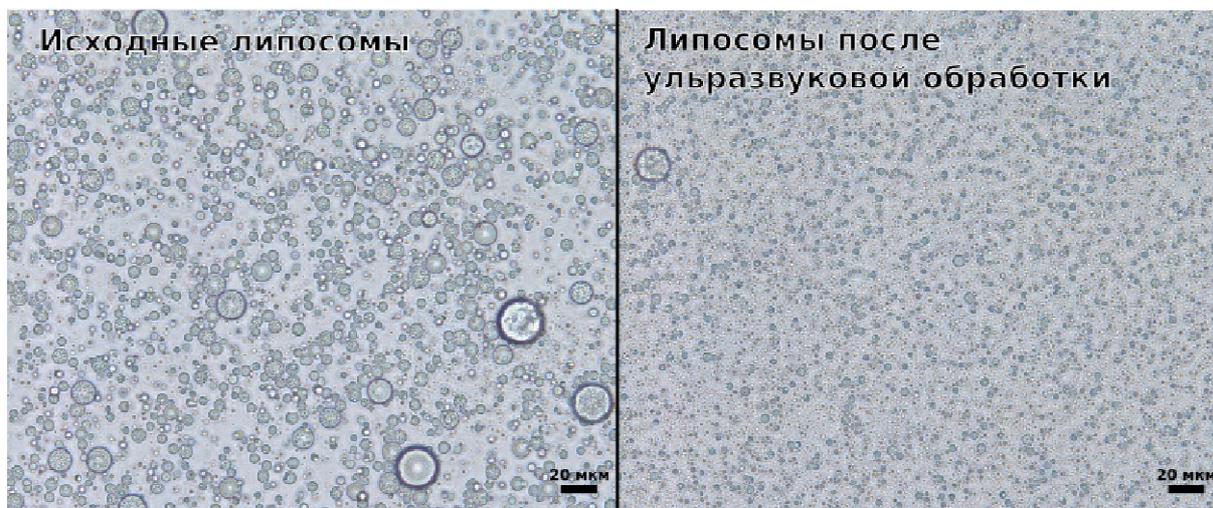


Рисунок 1 – Микрофотография свежеприготовленных и обработанных ультразвуком липосом (5 мкл Tween 80)

Как видно из рисунка 1, первоначальные липосомы полидисперсны и многослойны. Ультразвуковая обработка приводит к выравниванию распределения липосом по размерам и разрушению многослойных структур. При заданных условиях (температура, концентрация ПАВ и олеиновой кислоты) максимальной термодинамической устойчивостью обладают сферические однослойные липосомы фиксированного размера, и ультразвук облегчает переход липосом к средней равновесной форме. Важно отметить, что дальнейшая обработка ультразвуком (в том числе на повышенной мощности) не меняет средний диаметр липосом.

Предложенная методика, таким образом, позволяет получать однослойные липосомы с контролируемым средним диаметром и узким распределением по размерам сравнительно простым и легкодоступным путем, без применения высушенных липидных пленок и буферных систем. Полученные липосомы подходят для применения в качестве модельных систем для исследования процессов мембранного транспорта.

Список литературы

1. Bloemendal S., Kück U. Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review. // *Naturwissenschaften*. 2013. Vol. 100, № 1. P. 3–19.
2. Weissig V. *Liposomes. Methods and Protocols. Volume 2: Biological Membrane Models* / ed. Weissig V. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. Vol. 606.