

## ВКЛЮЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАММОНИЯ БРОМИДОМ, В СОСТАВ ЛИПОСОМ НА ОСНОВЕ СОЕВОГО ЛЕЦИТИНА

© 2022 г. Е.В. Шилова, И.А. Колтаков, С.В. Канныкин, В.Г. Артюхов

*Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1*

*E-mail: zinkovae@list.ru*

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 28.02.2022 г.

Принята к публикации 17.03.2022 г.

Обладая высокой биосовместимостью с клетками организма в силу состава из мембранобразующих липидов, липосомы могут быть использованы в качестве эффективного средства адресной доставки лекарственных препаратов при лечении заболеваний различной этиологии. Взаимодействие липосом с клетками-мишенями может принимать разные формы: адсорбция (прикрепление) на клеточной поверхности, эндоцитоз, слияние липосом с мембранами клеток. Внедрение в липосомы компонентов для активного управления внешним магнитным полем в виде магнитовосприимчивых наночастиц позволяет многократно повысить эффективность и скорость доставки лекарственных препаратов. Нами были получены липосомальные наночастицы, содержащие наночастицы магнетита. Для создания магнитоуправляемых липосом были использованы полученные в нашей лаборатории наночастицы магнетита диаметром  $4.2 \pm 1.2$  нм. Поверхность синтезированных частиц магнетита покрывали молекулами цетилтриметиламмония бромида, после чего включали магнетит в состав липосом из фосфатидилхолина. Количественную оценку интегрированных в липидный бислой липосом магнитовосприимчивых наночастиц проводили спектральными методами и методом просвечивающей электронной микроскопии. В ходе проведенных исследований показано, что модификация наноструктурированного магнетита цетилтриметиламмония бромидом повышает эффективность внедрения наночастиц магнетита в липидный бислой на 31.6%.

*Ключевые слова: наночастицы, магнитолипосомы, магнетит, ЦТАБ.*

DOI: 10.31857/S0006302922030139, EDN: AONQWD

Наночастицы на сегодняшний день применяются в различных областях медицины [1–3]. Липосомы, содержащие в своем составе магнитовосприимчивые наночастицы (магнитолипосомы), позволяют комбинировать диагностику и лечение, выступая в качестве контрастирующих веществ для магнитно-резонансной томографии наравне с терапевтическим действием. Более того, использование липосом решает проблему растворимости и коллоидной устойчивости магнитных наночастиц, которые в свободном состоянии коагулируют и формируют агрегаты в кровеносном русле, вызывая эмболию сосудов и ишемические повреждения клеток [4]. Однако при получении магнитолипосом и по сей день существует ряд проблем, главными из которых являются сложность получения наночастиц стандартизированного размера, достаточная степень включения лекарственного препарата. Знание механизмов взаимодействия компонентов нано-

систем для адресной доставки лекарственных средств необходимо для решения вышеуказанных и других вопросов при их получении.

В частности, остается открытым вопрос о способах включения магнитных наночастиц в структуру липосом, их интеграция в состав липосом может происходить различными путями, наиболее предпочтительным из которых является их включение в структуру липидного бислоя, это позволяет сохранить объем внутренней полости липосом для переноса большего количества лекарственного вещества, исключая взаимодействие магнетита с использованным препаратом [5, 6]. Известен ряд работ, посвященных вопросам включения магнитных наночастиц в бислой липосом, с этой целью производят гидрофобизацию поверхности наночастиц при помощи различных веществ [7–13]. По совокупности параметров (намагничиваемость, токсичность) магнетит является оптимальным вариантом. В связи с вышесказанным большой интерес представляет собой изучение распределения компонентов

*Сокращение: ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид.*

внутри системы для доставки лекарственных средств и стандартизация размеров получаемых наночастиц.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния модификации наночастиц магнетита цетилтриметиламмония бромидом на их включение в состав липосом на основе соевого лецитина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Синтез наночастиц магнетита, стабилизированных цетилтриметиламмония бромидом.** Наночастицы магнетита получали модифицированным методом Массарта путем соосаждения солей железа II и железа III в щелочной среде [14]. В качестве осаждающего реагента использовали 1%-й раствор аммиака, от которого наночастицы магнетита отмывали три раза дистиллированной водой. Поверхность полученных наночастиц магнетита была модифицирована цетилтриметиламмония бромидом (ЦТАБ) в концентрации 0.06 М, после чего наночастицы трижды отмывали дистиллированной водой и высушивали в лиофильной сушилке производства Labconco (США) [15].

**Синтез липосом из фосфатидилхолина и наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ЦТАБ.** Контрольные наночастицы и комплекс Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ЦТАБ были добавлены в состав натрий-фосфатного буфера к липосомам.

Липосомы готовили методом гидратации/регидратации, выпаривая 5 мл 1%-го раствора соевого лецитина в этиловом спирте на ротационном испарителе RV10 (ИКА, Германия) при температуре водяной бани 60°C. В результате на стенке испарительной колбы получали пленку липидов. Затем добавляли сантимолярный натрий-фосфатный буфер (рН 7.4) с наночастицами магнетита (1 мг/мл) в объеме, равном объему раствора лецитина в этиловом спирте, перемешивали в течение 1 мин.

Следующим этапом стала стандартизация получаемых липосом, для чего растворы были подвержены воздействию ультразвуком с помощью дезинтегратора Q500 (Qsonica Sonicators, США) в течение 15 мин (20 кГц, импульс длительностью 10 с и перерывом 3 с) [16].

**Методы контроля размера частиц.** Изображения Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) с использованием методики получения светопольных изображений [17]. Приготовление препаратов для исследования образцов порошков магнетита осуществляли следующим образом: предметные сетки с тонкой пленкой аморфного углерода погружали в водно-желатиновую суспензию порошка, измельченного в агатовой ступке. Лишнюю жидкость удаляли с помощью фильтровальной бумаги.

Состав полученных наночастиц контролировали методом рентгеновской дифракции на анализаторе ARL X'TRA (ThermoScientific, США).

Размер полученных липосом измеряли с помощью метода динамического светорассеяния Zeta-sizer Nano ZSP (Malvern, Великобритания).

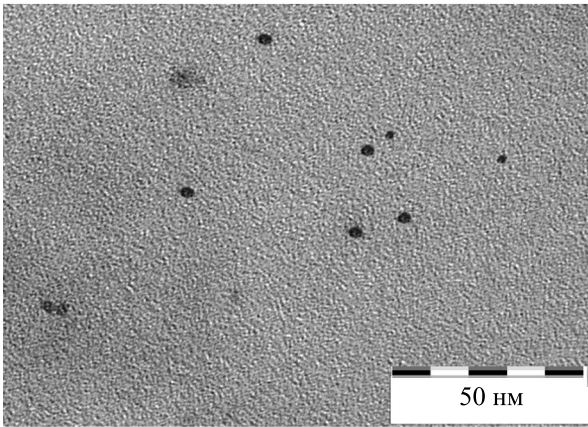
**Определение встраивания наночастиц Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ЦТАБ в липидную мембрану липосом.** Оценку встраивания магнетита в липосомы производили спектрофотометрическим методом. Синтезированные липосомы осаждали с помощью центрифугирования при 50000 об/мин в течение 20 мин на микроультрацентрифуге Sorvall MTX 150 (ThermoScientific, США) с использованием ротора S120-AT2, после чего отбирали супернатант и регистрировали оптическую плотность (магнетит, не вошедший в липосомы,  $D_1$ ). Осажденные липосомы ресуспензировали в объеме натрий-фосфатного буфера, равном изначальному, и разрушали путем инкубации в 1%-м растворе Triton X-100 в течение 1 ч. При использовании этого детергента происходит сольubilизация фосфолипидов с образованием смешанных мицелл либо червеобразных везикул [18]. Магнетит, находившийся изначально внутри липосом, при этом выходил в раствор. Затем опять производили осаждение образовавшихся структур при аналогичных условиях и отбирали супернатант (магнетит, находящийся во внутренней полости липосом,  $D_2$ ). Оптическую плотность регистрировали с помощью спектрофотометра UV 2401-PC (Shimadzu, Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 412 нм.

Процент встраивания наночастиц магнетита в мембрану липосом оценивали по формуле:

$$Hv = (1 - D^{412}_1 / D^{412}_{исх} - D^{412}_2 / D^{412}_{исх}) \times 100\%,$$

где  $Hv$  – количество включенного в мембрану липосом магнетита в процентах,  $D^{412}_1$  – оптическая плотность раствора после центрифугирования липосом,  $D^{412}_2$  – оптическая плотность раствора после разрушения и центрифугирования липосом,  $D^{412}_{исх}$  – оптическая плотность исходного раствора магнетита в буфере.

**Приготовление образцов липосом для просвечивающей электронной микроскопии.** Препараты липосом для исследования методом просвечивающей электронной микроскопии были подготовлены согласно работе [18]. В качестве контрастирующего вещества использовали 2%-й раствор OsO<sub>4</sub>. Изображения получали с помощью микроскопа JEM-100C (JEOL, Япония).



**Рис. 1.** Изображение наночастиц магнетита, полученное с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы методом просвечивающей электронной микроскопии был определен размер синтезированных нами магнитных наночастиц. Было проанализировано 100 наночастиц магнетита, размер которых рассчитывали с помощью программы Adobe Photoshop®.

Было установлено, что размер синтезируемых наночастиц составил  $4.2 \pm 1.2$  нм (рис. 1).

Для оценки качественного состава синтезируемого магнетита были зарегистрированы рентгенограммы наночастиц. Обнаруженные на рентгенограммах пики, соответствующие  $2\theta = 18, 30.20, 35.53, 43.1$  и  $57.1$ , соответствуют показателям стандартного образца магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (PDF-2 карта № 01-088-0315) (рис. 2).

Полученные наночастицы магнетита встраивали в липосомы из соевого лецитина, которые синтезировали методом гидратации/регидратации. Размер липосом контролировали методом динамического светорассеяния. Исследование показало, что полученные липосомальные наночастицы имеют размеры  $173.8 \pm 12.5$  нм (рис. 3). Данный размер позволяет рассматривать полученные нами липосомы в качестве возможного средства адресной доставки лекарственных препаратов.

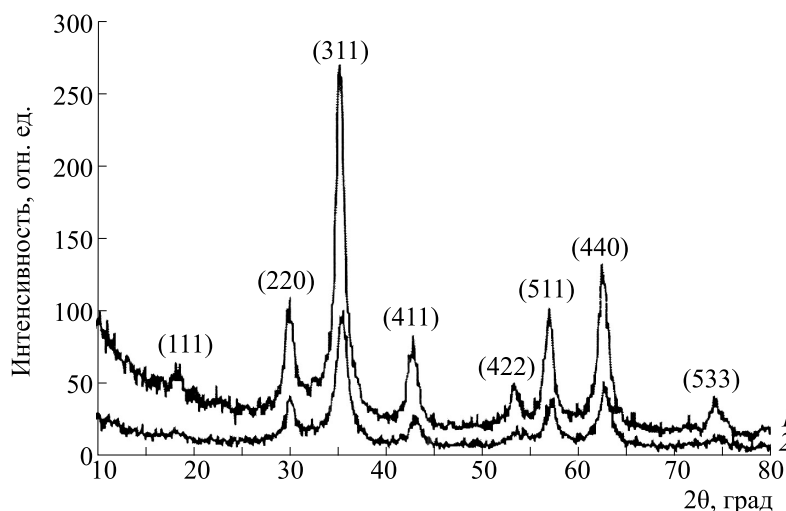
На следующем этапе работы оценивали встраивание в липосомы нестабилизированных частиц магнетита и частиц магнетита, покрытых молекулами ЦТАБ.

Исследования с помощью спектрофотометрического метода показали, что в случае магнетита без оболочки наблюдается включение  $49.2 \pm 0.5\%$  магнетита, при использовании покрытия в виде ЦТАБ в липидный бислой включается  $80.8 \pm 0.5\%$  магнетита (таблица).

На рис. 4 представлены характерные электронномикроскопические изображения липосом с адсорбированными наночастицами магнетита. На микрофотографиях липосом с наночастицами  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ЦТАБ (рис. 4в) заметно увеличение числа наночастиц магнетита, встроенных в липидный бислой, по сравнению с частицами, немодифицированными ЦТАБ (рис. 4б).

Увеличение доли встроенных в липидную мембрану наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  обусловлено взаимодействием гидрофобной углеводородной цепи молекулы ЦТАБ ( $[\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$ ) и гидрофобных остатков жирных кислот молекул фосфатидилхолина.

Следовательно, покрытие наночастиц магнетита молекулами ЦТАБ способствует встраива-



**Рис. 2.** Рентгенограмма наночастиц магнетита: 1 –  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , 2 –  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – ЦТАБ.

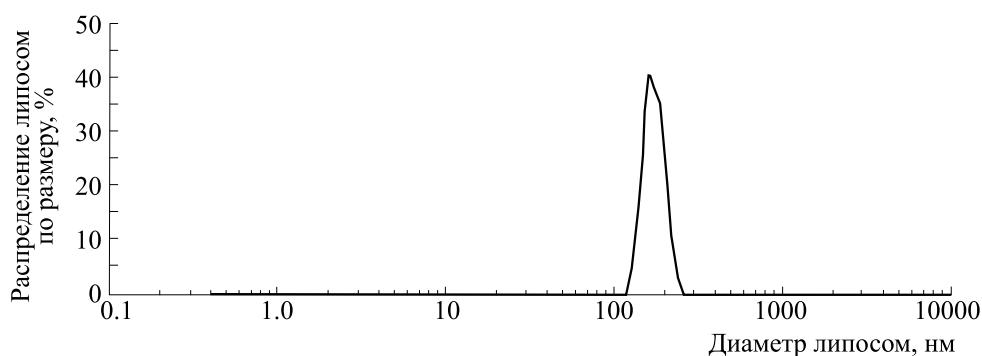


Рис. 3. Распределение по размерам липосом из соевого лецитина с включенными наночастицами магнетита.

Определение распределения магнетита в структуре липосом спектрофотометрическим методом

	Включение в липидный бислой, %	Включение во внутреннюю полость, %	Невключившийся магнетит, %
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$49.2 \pm 0.5$	$32.1 \pm 0.5$	$18.9 \pm 0.1$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ЦТАБ	$80.8 \pm 0.5$	$13.9 \pm 0.2$	$5.2 \pm 0.3$

нию наночастиц в структуру липидного бислоя липосом. В результате происходит увеличение свободного пространства во внутренней полости липосом, что позволит доставлять к клеткам-мишеням большее количество гидрофильных лекарственных препаратов.

Так как одной из главных проблем при синтезе липосом является их высокая склонность к агрегации, нами были проведены исследования по контролю изменений размера полученных нами липосом. Было показано, что увеличение размеров липосом происходит уже через 2 ч в обоих образцах (рис. 5).

Таким образом, по данным динамического светорассеяния мы можем сделать вывод о том, что покрытие ЦТАБ наночастиц магнетита не влияет на склонность липосом к агрегации. Столь быстрое увеличение размеров синтезированных липосом связано с тем, что в данной работе эксперименты проводились на модельных липосомах, липидный бислой которых состоит только из фосфатидилхолина, который при физиологических значениях pH имеет суммарный нейтральный заряд. Поэтому для применения в клинической практике необходимо включать в состав липосом отрицательно заряженные липиды.

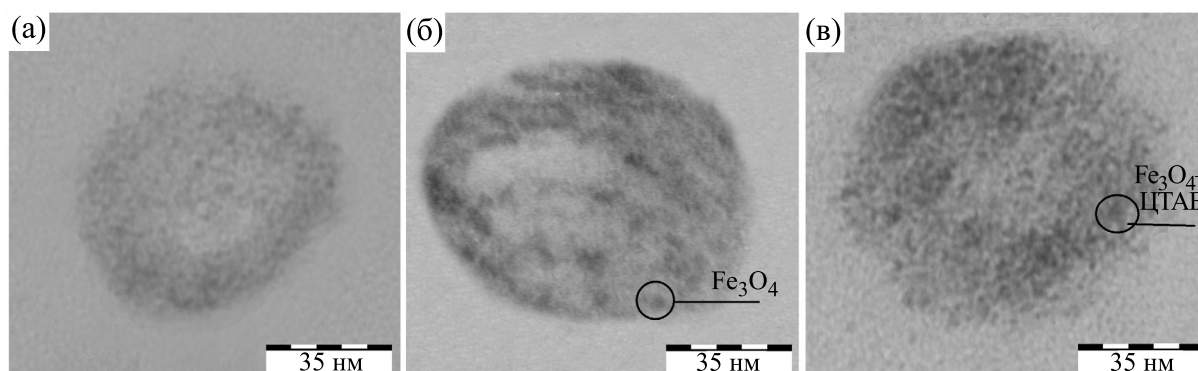
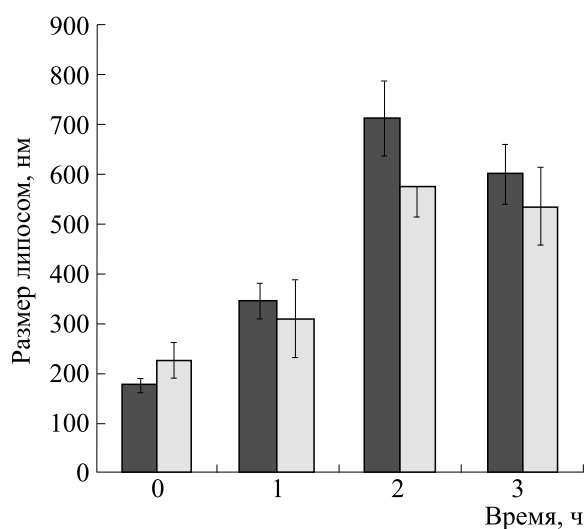


Рис. 4. Изображения липосом, полученные с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии: (а) — липосомы без добавления магнетита; (б) — липосомы с включенными наночастицами магнетита; (в) — липосомы с включенными наночастицами магнетита, покрытыми ЦТАБ.



**Рис. 5.** Изменение размеров полученных липосом в течение времени: темные столбики – липосомы с магнетитом без покрытия; светлые столбики – липосомы с наночастицами магнетита, покрытыми ЦТАБ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных нами исследований было изучено влияние покрытия наночастиц магнетита цетилтриметиламмония бромидом на их встраивание в липосомы из соевого лецитина.

Синтезированные магнитные наночастицы магнетита обладают необходимыми размерными характеристиками для встраивания в липидный бислой липосом.

Таким образом, интегрирование магнитных наночастиц в структуру липидного бислоя при получении магнитоуправляемых липосом позволит снизить риск взаимодействия вводимого в них препарата с материалом самих наночастиц, а рост свободного объема внутренней полости, вследствие ее освобождения от включенного наноматериала, сделает возможным увеличить удельное содержание доставляемого к клеткам-мишеням лекарственного препарата с одновременным снижением количества вводимых в организм липосом.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Результаты исследований были получены на оборудовании лаборатории электронной микроскопии ЦКПНО ВГУ (контроль размера получаемых наночастиц) и сектора электронной микроскопии ЦКП ПНЦБИ РАН (исследования препаратов липосом методом просвечивающей электронной микроскопии).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования

Российской Федерации в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020–2022 годы, проект №FZGU-2020-0044.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. А. Наквасина и В. Г. Артюхов, *Основы бионанотехнологии* (Издательский дом ВГУ, Воронеж, 2016).
2. C. Buzea, I. P. Blandino, and K. Robbie, *Biointerphases* **2** (4), MR17 (2007).
3. В. Н. Никифоров, *Изв. Академии инженерных наук им. А. М. Прохорова*, № 1, 23 (2013).
4. De Mrinmoy, P. S. Ghosh, and V. M. Rotello, *Adv. Mater.* **20**, 4225 (2008).
5. M. Auffan, J. Rose, and M. R. Wiesner, *J. Bottero Environ. Pollution* **157**, 1127 (2009).
6. J. Kohlbrecher, E. Müller, Th. Schweizer, et al., *Nano Lett.* **11** (4), 1664 (2011).
7. Y. Chen, Y. Chen, D. Xiao, et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **116**, 452 (2014).
8. C. Berry and A. Curtis, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, R198 (2003).
9. A. H. Lu, E. L. Salabas, and F. Schuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 1222 (2007).
10. P. B. Santhosh, B. Drašler, D. Drobne, et al., *Int. J. Nanomed.* **10**, 6089 (2015).

11. J. Santoyo-Salazar, M. A. Castellanos-Roman, and L. B. Gomez. *Mater. Sci. Engineer.* **27**, 1317 (2007).
12. S. Laurent, D. Forge, M. Port, et al., *Chem. Rev.* **108**, 2064 (2008).
13. K. K. Kadyrzhanov, K. Egizbek, A. L. Kozlovskiy, and M. V. Zdorovets, *Nanomaterials (Basel)* **9** (8), 1079 (2019).
14. R. Massart, *IEEE Trans. Magn.* **17** (2), 1247 (1981).
15. О. Р. Егунова, Дисс. ... канд. хим. наук (Саратовский гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 2017).
16. Е. В. Шилова, В. Г. Артюхов, Е. Д. Скорбач и др., *Нанотехнологии: разработка, применение – XXI век*, № 4, 9 (2018).
17. П. Хирш и др., *Электронная микроскопия тонких кристаллов* (Мир, М., 1968).
18. K. Asami, *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **95**, 38 (1986).
19. С. В. Герман, Дисс. ... канд. ф.-м. наук (Саратовский гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 2015).

## **Inclusion of Magnetite Nanoparticles Stabilized with Cetyltrimethylammonium Bromide in the Composition of Liposomes Prepared Using Soy Lecithin**

**E.V. Shilova, I.A. Koltakov, S.V. Kannykin, and V.G. Artyukhov**

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia*

Liposomes provide high biocompatibility with the cells of the human body due to the prevalence of membrane lipids in their composition and can be used as an effective tool for targeted delivery of drugs against diseases of different etiology. Interactions between liposomes and target cells can be different: adsorption on the cell surface, endocytosis, fusion of liposomes with cell membranes. However, by incorporation of magnetic nanoparticles into liposomes for active control of an external magnetic field, it is possible to enhance the efficiency and rate of drug release. To create magnetically controlled liposomes, we have chosen nanostructured magnetite obtained in our laboratory. In this work, we used nanoparticles of diameter  $4.23 \pm 1.19$  nm. Surfaces of synthesized magnetite nanoparticles were covered with molecules of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), after that magnetite nanoparticles were included into the composition of liposomes formed with phosphatidylcholine. Quantitative analysis of magneto-sensitive nanoparticles embedded in the lipid bilayer was carried out by spectrophotometry and using the transmission mode in an electron microscope. This study showed that modification of nanostructured magnetite with CTAB increases the efficiency of magnetite nanoparticles incorporation into the lipid bilayer by 31.6%.

*Keywords: nanoparticles, magnetoliposomes, magnetite, CTAB*