УДК 541.18:547.995.15

Низкомолекулярные алкилированные хитозаны как невирусные векторы трансфекции для генной терапии

К. Занг, С. Эрселен, В. Е. Тихонов, С. З. Караева, А. В. Слита, В. В. Зарубаев, И. Мели, Г. Дюпортай, В. Г. Бабак

КСИН ЗАНГ (XIN ZHANG) — аспирантка Докторской школы г. Страсбурга, группа фотофизики биомолекулярных взаимодействий отдела фармакологии и физикохимии Института Жильбера Лостриа (Фармацевтический факультет, Университет Луи Пастера, Франция). Область научных интересов: модифицированные хитозаны.

СЕБНЕМ ЭРСЕЛЕН (SEBNEM ERCELEN) — доктор философии (PhD) Медицинского факультета Стамбульского университета, старший научный сотрудник Научного центра TUBITAK marmara (Турция). Область научных интересов: флуоресцентная техника.

ВЛАДИМИР ЕВГЕНЬЕВИЧ ТИХОНОВ — кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории физиологически активных биополимеров Института элементоорганических соединения им. А.Н. Несмеянова РАН (ИНЭОС РАН). Область научных интересов: биополимеры.

СВЕТЛАНА ЗУБАИРОВНА КАРАЕВА — старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной физики Комплексного научно-исследовательского института РАН (г. Грозный, Российская Федерация) Область научных интересов: термодинамика межфазных слоев, неравновесная термодинамика.

АЛЕКСАНДР ВАЛЕНТИНОВИЧ СЛИТА — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии Научно-исследовательского института гриппа РАМН. Область научных интересов: генотерапия и иммунология вирусных инфекций. E-mail slita@influenza.spb.ru

ВЛАДИМИР ВИКТОРОВИЧ ЗАРУБАЕВ — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных основ химиотерапии вирусных заболеваний Научно-исследовательского института гриппа РАМН. Область научных интересов: химиотерапия вирусных и опухолевых заболеваний. E-mail zarubaev@influenza.spb.ru.

ИВ МЕЛИ (YVES MÉLY) — профессор биофизики, руководитель группы фотофизики биомолекулярных взаимодействий отдела фармакологии и физикохимии Института Жильбера Лостриа (Фармацевтический факультет, Университет Луи Пастера, Франция). Область научных интересов: флуоресцентные методы в изучении молекулярных взаимодействий в белковых системах.

ГИЙ ДЮПОРТАЙ (GUY DUPORTAIL) — доктор философии (PhD), старший научный сотрудник группы фотофизики биомолекулярных взаимодействий отдела фармакологии и физикохимии Института Жильбера Лостриа (Фармацевтический факультет, Университет Луи Пастера, Франция). Область научных интересов: биологические мембраны; физикохимия невирусных трансфекционных процессов с помощью катионных векторов. E-mail guy.duportail@pharma.u-strasbg.fr

ВАЛЕРИЙ ГЕОРГИЕВИЧ БАБАК — доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории физической химии полимеров ИНЭОС РАН. Область научных интересов: нано- и микрокапсулирование биологически-активных веществ; физикохимия ПАВ-полиэлектролитных и интерполиэлектролитных комплексов; дилатантная реология межфазных адсорбционных и ленгмюровских слоев ПАВ и полиэлектролитов; высококонцентрированные эмульсии; термодинамика микроскопических жидких пленок и линейного натяжения.

119991 Москва, ул. Вавилова, 28 ИНЭОС РАН, тел. (499)135-65-02, факс (499)135-50-85, babak@ineos.ac.ru

197376 Санкт-Петербург, ул. проф. Попова 15/17, ГУ НИИ гриппа РАМН, т.(812)234-67-25, ф.(812)234-59-73

Введение

Успехи генной терапии связаны с существованием доступных векторов, способных эффективно и с минимальной токсичностью доставлять генетический материал в клетки-мишени. Синтетические катионные липиды и полимеры образуют электростатические комплексы с полианионами, какими являются молекулы ДНК, приводя к конденсации последних, т.е. к сворачиванию макромолекулярной цепи в компактные агрегаты. Интерполиэлектролитное комплексообразование между противоположно заряженными полимерами практиче-

ски необратимо и приводит к возникновению полидисперсных микрочастиц из нескольких сотен молекул ДНК. Такие комплексы неоднородны по составу, размерам (50—500 нм) и форме (тороиды, палочки, агрегаты) [1]. Большие размеры этих агрегатов способствуют их эффективному контакту с поверхностью клеток при седиментации и эффективной трансфекции ДНК в клеточные культуры. В то же время, использование таких агрегатов в опытах *in vivo* является более чем проблематичным из-за их низкой диффузионной подвижности.

Напротив, небольшие компактные комплексы с одной молекулой ДНК могут быть получены на основе катионных ПАВ [2—5]. Показано, что в таких комплексах макроион ДНК сворачивается вокруг мицеллоподобных агрегатов ПАВ, в результате чего они оказываются отрицательно заряженными, что предотвращает их агрегацию из-за взаимного электростатического отталкивания. Комплексы с одной молекулой ДНК легко преодолевают физиологический барьер из-за малых размеров. С другой стороны, эти комплексы неустойчивы и диссоциируют при контакте с плазмидной мембраной [3], что объясняет их слабую трансфекционную эффективность. Более того, такие комплексы цитотоксичны и приводят к лизису клетки [6].

В этом контексте целью работы стала разработка и характеристика новых типов векторов на базе молекул олигохитозана, способных к мицеллообразованию в результате ковалентного присоединения к ним длинных алкильных цепей. Такой подход оправдан из-за нетоксичности хитозанов даже при повышенной концентрации, в отличие от других типов невирусных векторов, таких как полиэтиленимин (ПЭИ) или катионные липиды.

Хитозаны являются сополимерами 2-амино-2-дезокси-β-D-глюкозамина и 2-ацетамидо-2-дезокси-β-D-глюкозамина, связанных β(1→4) связями, полученными в результате щелочного деацетилирования хитинов, экстрагированных в основном из панцырей членистоногих, насекомых и грибов. Функциональные свойства этих катионных полиэлектролитов зависят от молекулярной массы, полидисперсности, степени деацетилирования и микроструктуры (распределения сомономеров по длине цепи). Многочисленные производные хитозанов проявляют нетоксичность, биоразлагаемость, биосовместимость и слабую иммуногенность [7, 8]. Эти катионные полиэлектролиты являются потенциальными кандидатами для использования в качестве векторов переноса генов [9—12]. Действительно, они образуют комплексы с отрицательно заряженными макромолекулами ДНК, защищая их от деструкции нуклеазами [13—17]. Комплексы ДНК-хитозан используют в экспериментах по трансфекции ДНК *in vitro* [18—20].

Хитозан является слабым основанием с pK_a = 6,5, что близко значению pK_a остатков D-глюкозамина [21]. Высокомолекулярный хитозан практически не растворим в воде при нейтральных pH, что ограничивает его применение в биомедицине. Эта проблема может быть решена при использовании низкомолекулярных хитозанов, которые растворимы в воде в широком диапазоне pH и сохраняют способность к конденсации ДНК, но мало эффективны при трансфекции [22—26]. Аналогичные явления наблюдались и для кватернизованных олигохитозанов, в которые вводили четвертичные аммониевые группы для увеличения их растворимости в воде и усиления электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными ДНК [25]. Было высказано предположение, что относительно слабая эффективность трансфекции обусловлена низкой гидрофобностью достаточно объемных макромолекулярных клубков, образующихся при конденсации ДНК с такими олигохитозанами.

В связи с этим, придание олигохитозанам свойств ПАВ могло бы явиться интересной возможностью улучшения их эффективности в качестве невирусных векторов трансфекции. Это возможно реализовать путем алкилирования низкомолекулярных хитозанов при условии, что существенного снижения их растворимости в воде не произойдет. С этой целью мы синтезировали серию олигохитозанов с различным содержанием тетрадеценоильных (ТДЦ) цепей [27]. В данной работе представлены данные по поверхностной активности таких олигохитозанов и результаты исследования их взаимодействия с фосфолипидными липосомами, которые рассматривались как модели биологических мембран.

Объекты и методы исследования

Химические вещества. В работе использованы L-α-фосфатидилхолин, димиристил (DMPC) и L-αфосфатидил-DL-глицерин (DMPG) фирмы Sigma; 2-(3-дифенилгексатриенил)пропаноил-1-гексадеканоил-*син*-глицеро-3-фосфохолин (DPHpPC) фирмы Molecular Probes и высокомолекулярный хитозан (M = 300 кДа, степень ацетилирования 18%) компании BioChit, Москва, Россия.

Получение и характеристика производных хитозана. N-[2(3)-(додец-2-енил)сукциноил/хитозаны] — гидрофобно модифицированные хитозаны (ГМ-хитозаны) были получены реакцией высокомолекулярного хитозана с 2-(додеценил)янтарным ангидридом (SIGMA) как описано в [28]. Низкомолекулярный (НМ) хитозан и его N-2(3)-(додец-2-енил) сукциноильные производные — гидрофобно модифицированные низкомолекулярные хитозаны (ГМ-НМХ) были приготовлены кислотным гидролизом соответствующих высокомолекулярных хитозанов в соответствии с ранее описанной методикой [29]. ГМ-НМХ содержали ненасыщенные ТДЦ группы (m), N-ацетильные (n) и амино группы (p), как показано на рис. 1. Каждая гидрофобная ТДЦ группа, содержащая цепь C_{14}, связана с одной гидрофильной карбоксильной группой, что частично компенсирует снижение растворимости при введении гидрофобной группировки в молекулу хитозана.

Содержание ТДЦ групп и степень ацетилирования были рассчитаны из ПМР спектров. Спектры были сняты на приборе AC400 Bruker spectrometer [30]. Молекулярные массы хитозанов были определены методом эксклюзионной хроматографии [31].

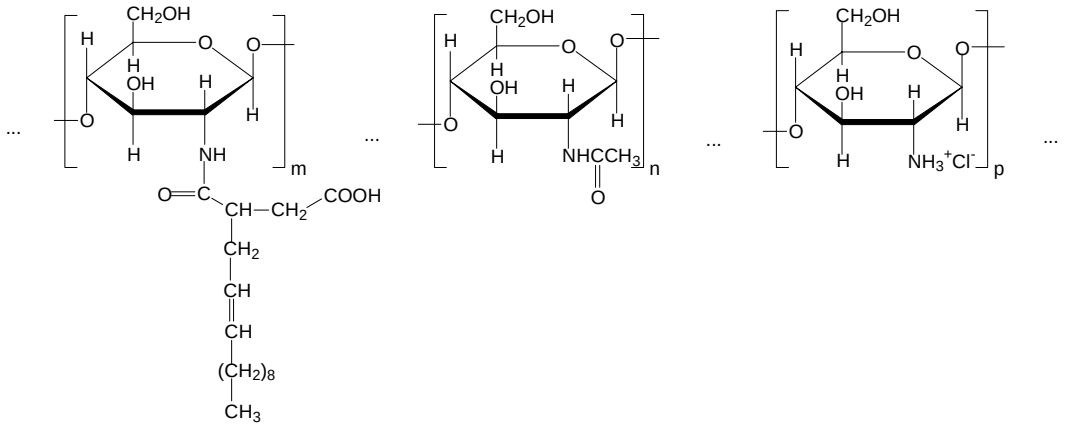


Рис. 1. Гидрофобно модифицированные низкомолекулярные хитозаны

Методы исследования. Поверхностное натяжение (γ) водных растворов ГМ-НМ-хитозанов на границе вода-воздух измерялось методом пластинки Вильгельми с помощью тензиометра K100 (Kruss).

Критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) определяли по точке перегиба на изотермах γ(*C*) и методом флуоресценции с использованием гидрофобного зонда Нильского красного (Nile Red): $\lambda_{возб}$ = 550 нм; концентрация 0,2 мкМ [32]. Значения ККМ определялись по резкому увеличению интенсивности флуоресценции, а также по гипсохромному смещению спектра эмиссии при увеличении концентрации хитозана в растворе.

Моноламелярные липосомы большого размера получали экструзией суспензии мультиламеллярных липосом (MLV) через поликарбонатный фильтр (Nucleopore) на термостатируемом экструдере (Lipex Biomembranes) [3—5, 33]. Размер пор фильтра в начале был 0,2 мкм (семь фильтраций), затем 0,1 мкм (десять фильтраций). В результате получали гомогенную популяцию липосом размером от 0,11 до 0,12 мкм, который определяли методом квазиупругого рассеяния света (Nanosizer N4SD Coultronics).

Измерения анизотропии флуоресценции в стационарном состоянии (*r*) проводили на спектрофлуориметре SLM 8000 [3]. Результаты измерений обрабатывались с помощью программы Biokine, разработанной Biologic (Claix, Франция). Размер мицелл и комплексов ГМ-НМХ измеряли методом динамического светорассеяния на приборе Zetamaster 3000 (Malvern Instruments, Франция) при следующих параметрах: время измерения 30 с, вязкость среды 1,054 Па, индекс рефракции 1,45 (равный индексу рефракции для липосом), угол рассеяния 90 °, температура 25 °C.

Цитотоксичность ГМ-НМХ оценивали с использованием 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ) [3]. Клетки HeLa были посеяны в 96-луночные планшеты с плотностью $5 \cdot 10^4$ клеток в ячейке и инкубированы в течение 24 ч. ГМ-НМХ добавляли к клеткам в присутствии 10% СПК (сыворотки плода коровы) или без нее. Через 3,5 ч трансфекции клетки промывали фосфатным солевым буфером (ФСБ), и 250 мкл раствора с 0,5 мг/мл МТТ в среде ДМЕМ (Dulbecco Modificated Eagle's Medium) добавляли в каждую ячейку и оставляли на дополнительную инкубацию в течение 1 ч при 37 °C. Среду, содержащую МТТ, затем удаляли и вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) для растворения кристаллов формазана, образующегося в митохондриях в процессе клеточного дыхания. Абсорбционные измерения проводили при 535 нм на приборе Labsystems IEMS Microplate Reader.

Результаты и обсуждение

Характеристика гидрофобно модифицированных низкомолекулярных хитозанов

Три образца ГМ-НМХ были приготовлены согласно ранее описанному методу [27] и охарактеризованы методами ЯМР и эксклюзионной хроматографии (табл.1). Их молекулярная масса составляла 5 кДа и степень деацетилирования ~ 3%(мол.). Следовательно, все эти образцы содержали до 25—30 глюкозаминных групп и одну ацетамидную группу на молекулу. Таким образом, среднее число (n_{14}) ТДЦ групп в образцах при их содержании 3, 10 или 18% было равно соответственно 0,75, 2,5 и 4,5 на одну молекулу хитозана. Все хитозаны имели узкое молекулярно-массовое распределение, M_w/M_n ~ 1,1 и были растворимы в воде при нейтральных pH. Это связано, по-видимому, с присутствием в их структуре карбоксильных групп и с их низкой молекулярной массой [24, 34], что компенсирует относительно невысокую степень протонирования (pK_a ~ 6,5) [21]. Состав, молекулярный вес и полидисперсность хитозанов определены методами ЯМР и хксклюзионной хроматографии.

Таблица 1

Характеристики ГМ-НМ-хитозанов

Образец	СА*, %	ТДЦ, %	n_{14}	M_w	M_n	M_w / M_n
ГМ(3%)-НМХ	3	3	0,75	4720	4220	1,12
ГМ(10%)-НМХ	3	10	2,5	4780	3840	1,26
ГМ(18%)-НМХ	4	18	4,5	3580	3300	1,09

* СА — степень ацетилирования

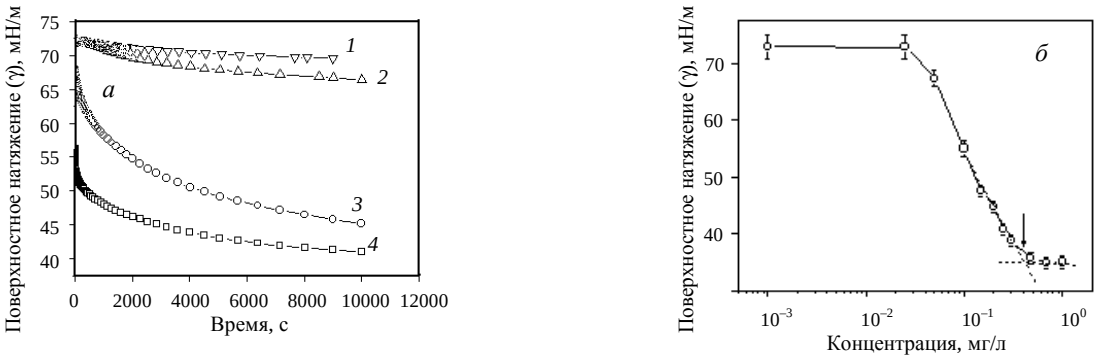


Рис. 2. Поверхностная активность ГМ-НМ-хитозанов:

а — кинетика изменения поверхностного натяжения водных растворов ГМ-НМХ: pH = 6,5; 0,1 мг/мл ГМ-НМХ; содержание ТДЦ групп: *1* — 0%; *2* — 3%; *3* — 10%; *4* — 18 %.

б — изотерма поверхностного натяжения γ(*C*) для ГМ(18%)-НМ-хитозана.

Поверхностное натяжение и критическая концентрация мицеллообразования хитозанов

ККМ молекул ГМ-НМХ определяли методом тензиометрии (рис. 2) и по интенсивности флуоресценции Nile Red (рис. 3) [32]. В то время как исходный НМХ не проявлял практически никакой поверхностной активности, при его гидрофобной модификации заметно снижалось поверхностное натяжение γ с ростом времени адсорбции (рис. 2*а*). Снижение γ возрастало с ростом числа ТДЦ групп и было максимальным для ГМ(18%)-НМ-хитозана.

Можно предположить, что адсорбция ГМ(3%)-НМ-хитозана на границе вода—воздух является обратимой, поскольку выигрыш в свободной энергии при адсорбции одной цепи ТДЦ составляет $\Delta G_{ad} \sim 10\ kT$ [35]. Следовательно, для этого образца, имеющего в среднем только одну ТДЦ цепь, можно ожидать достижения равновесных значений адсорбции и поверхностного натяжения. Например, равновесное значение γ_{eq} = 68 мН/м (кривая *2*, рис. 2*а*) было найдено интерполяцией экспериментальной кривой мультиэкспоненциальной функцией [36]. При увеличении числа (n_{C14}) ТДЦ цепей на одну молекулу хитозана выигрыш свободной энергии адсорбции увеличивается как $\Delta G_{ad} \sim -10.n_{C14}.kT$, следовательно, процесс адсорбции таких образцов на границе вода—воздух перестает быть обратимым. С целью унификации результатов тензиометрических измерений, все значения поверхностного натяжения при построении изотерм адсорбции были отнесены к одному времени формирования адсорбционных слоев, равному 1000 с. К этому времени поверхностное натяжение для всех образцов переставало заметно уменьшаться. В качестве примера на рис. 2*б* представлена изотерма поверхностного натяжения для ГМ(18%)-НМ-хитозана. Эта изотерма позволяет определить значение ККМ как концентрации, по достижении которой поверхностное натяжение перестает уменьшаться. Для этого образца было найдено значение ККМ = 0,4 мг/мл.

Поскольку известно, что значения ККМ зависят от метода их определения [37—39], мы также определяли ККМ для всех трех образцов по интенсивности флуоресценции Nile Red [32]. Этот гидрофобный зонд плохо растворим в воде и весьма слабо флуоресцирует в ней. С другой стороны, его растворимость и флуоресценция сильно возрастают в гидрофобной среде, например, внутри мицелл. Следовательно, ККМ определялась как пороговое значение возрастающей концентрации хито-

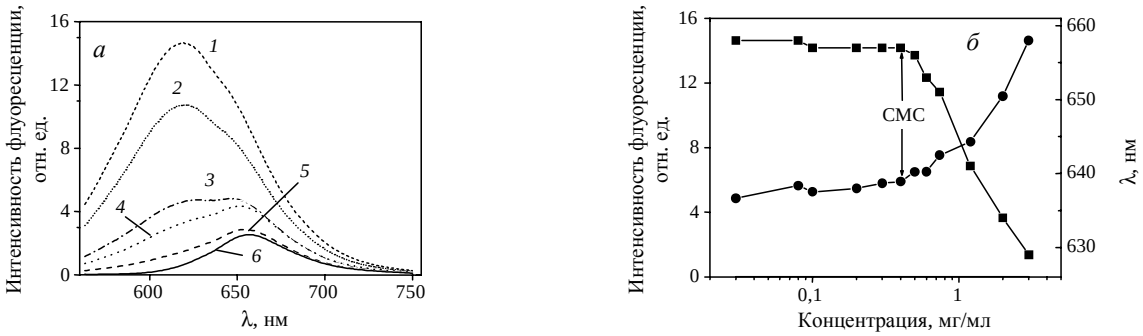


Рис. 3. Определение ККМ для ГМ-НМ-хитозанов по флуоресценции Nile Red:

а — спектры флуоресцентного излучения от Nile Red (0,2 мкМ) при различных концентрациях ГМ(18%)-НМ-хитозана: *1* — 5 мг/мл; *2* — 3 мг/мл; *3* — 0,8 мг/мл; *4* — 0,4 мг/мл; *5* — 0,2 мг/мл; *6* — 0,01 мг/мл. Буфер 20 мМ MES; pH = 6,5; $\lambda_{возб}$ = 550 нм.

б — интенсивность флуоресценции (●) и положение максимума излучения от Nile Red (■) как функция концентрации ГМ(18%)-НМ-хитозана.

занов, отвечающее резкому возрастанию интенсивности флуоресценции Nile Red. В качестве примера, на рис. 3*а* представлен спектр флуоресценции зонда с ростом концентрации ГМ(18%)-НМ-хитозана при pH = 6,5 (рис. 3*б*). Значению ККМ отвечают как сильное увеличение интенсивности флуоресценции, так и сильное гипсохромное смещение, связанное с фиксацией Nile Red в гидрофобной области мицелл.

Значения ККМ образцов ГМ-НМ-хитозанов, определенные тензиометрией и по интенсивности флуоресценции, представлены в табл. 2. Эти значения, найденные двумя методами, хорошо согласуются и дают одинаковую зависимость от ТДЦ. Отнесенные к молекулярной массе хитозанов, значения ККМ равны соответственно 0,6 мМ и 0,1 мМ. Сильная зависимость значений ККМ от ТДЦ указывает на то, что гидрофобные взаимодействия между ТДЦ группами являются основной движущей силой агрегирования между этими молекулами. Это согласуется с общепринятыми представлениями о мицеллообразовании, при котором выигрыш в свободной энергии, связанный с переносом гидрофобных цепей из водной среды внутрь мицелл становится равным потере переносной энтропии растворенных молекул ПАВ и их противоионов [40].

Строение мицелл, образованных различными ГМ-НМ-хитозанами, зависит от степени гидрофобного модифицирования этих образцов (рис. 4). Образец ГМ(3%)-НМ-хитозана, который имеет в среднем всего одну алкильную группу на макроион, вероятно образует «интерполиэлектролитные комплексы», которые похожи на мицеллы «классических» ионных ПАВ (рис. 4*а*). Такие мицеллы имеют внешнюю корону, образованную частично ионизованными гидрофильными глюкозаминными группами. Притяжение между неионизованными глюкозаминными группами, которые гидрофобны и способны в непротонированной форме образовывать водородные связи, вероятно также способствует мицеллообразованию.

В отличие от ГМ(3%)-НМ-хитозана, образцы, модифицированные на 10 и 18%, в среднем содержат соответственно 2 и 4,5 алкильных цепей на одну молекулу и

Таблица 2

Значения ККМ водных растворов ГМ-НМ-хитозанов, определенные методами флуоресценции и тензиометрии

Образец	Тензиометрия		Флуоресценция	
	мг/мл	мМ	мг/мл	мМ
ГМ(3%)-НМХ	2,5	0,6	5,0	1,1
ГМ(10%)-НМХ	0,7	0,2	2,0	0,4
ГМ(18%)-НМХ	0,4	0,1	0,4	0,1

могут образовывать мицеллярные агрегаты при взаимодействии алкильных цепей, которые не включены в ядро мицелл (рис. 4 *б, в*).

Короны мицелл в таких агрегатах образованы как гидрофильными хвостами и петлями, так и алкильными цепями, не включенными в гидрофобные ядра. Взаимодействие между такими алкильными цепями приводит к образованию интермицеллярных кластеров, которые образуют нано- и микрочастицы геля [41]. Меньшее количество алкильных цепей у ГМ(10%)-НМ-хитозана приводит к меньшей их плотности на поверхности мицелл по сравнению с ГМ(18%)-НМ-хитозаном, следовательно, интермицеллярные кластеры в случае ГМ(10%)-НМ-хитозана будут менее устойчивыми.

Сравнение значения ККМ = 0,6 мМ для катионного ГМ(3%)-НМ-хитозана со значениями ККМ классических катионных ПАВ серии алкилтриметиламмоний бромидов, таких как ДТАБ, ТТАБ и ЦТАБ с алкильными цепями длиной 12, 14 и 16 атомов углерода, равными соответственно 15 мМ, 3,5 мМ и 0,92 мМ, [42, 43], показывает практическое равенство между ККМ ГМ(3%)-НМ-хитозана и ЦТАБ имеющего гидрофобную цепь C_{16}. Это равенство означает, что свободная энергия, затрачиваемая на концентрирование положительно заряженных глюкозаминных групп на поверхности мицелл (рис. 4*а*), близка к соответствующей энергии концентрирования триметиламмониевых групп. Это достаточно неожиданно, если учесть значительную разницу в объеме полярных групп, и может быть рационально объяснено, если принять во внимание незначительный вклад электростатического отталкивания в свободную энергию мицеллообразования [40, 44, 45].

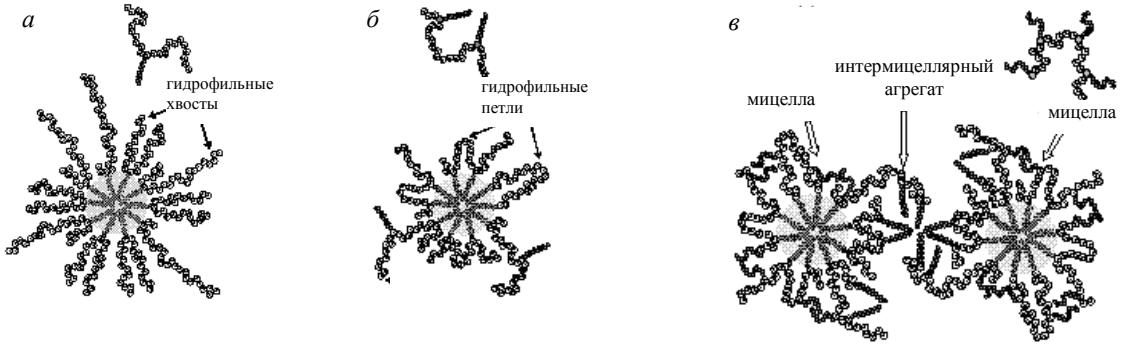


Рис. 4. Схематическое представление вероятных мицеллярных структур ГМ-НМ-хитозанов с разным числом ТДЦ групп:
а — мицеллы в случае ГМ (3%)-НМ-хитозана с одной ТДЦ группой; *б* — ГМ(10%)-НМ-хитозана; *в* — ГМ(18%)-НМ-хитозана.

Действительно, было показано, что среднее расстояние между ТМА группами ($l_{N(CH3)3}$) катионных ПАВ на поверхности мицелл равно характерной длине Бьеррума в воде ($l_B = e^2/4\pi\varepsilon_0\varepsilon kT$ = 0,7 нм) [42, 43], что означает, что энергия электростатического отталкивания между этими группами порядка 1 *kT*. Эта энергия на порядок меньше энергии гидрофобного взаимодействия между алкильными цепями в ядре мицеллы [35]. Учитывая большой размер глюкозаминных групп, среднее расстояние между аминогруппами на поверхности мицелл ГМ(3%)-НМ-хитозана очевидно значительно больше по сравнению с длиной Бьеррума и, следовательно, электростатическое отталкивание между этими группами значительно меньше. Снижение энергии электростатического отталкивания компенсируется большим числом заряженных групп у образца хитозана, что приводит к одинаковым значениям ККМ для ГМ(3%)-НМ-хитозана и ЦТАБ. Следует также принять во внимание, что приблизительно половина аминогрупп у этого хитозана не ионизирована при pH = 6,5 [21] и соответствующие глюкозаминные группы могут вносить вклад в энергию мицеллобразования, учитывая их слабую гидрофобность [29].

Если формально выразить ККМ через концентрацию алкильных цепей в растворе, $C_{TDC} = n_{C14}$ККМ, мы получим значения 0,45 мМ, 0,42 мМ и 0,45 мМ для образцов хитозана, имеющих в среднем n_{C14} = 0,75, 2,5 и 4,5 алкильных цепей на молекулу хитозана. Это удивительное равенство значений C_{TDC} указывает на то, что молекулы ГМ-НМ-хитозанов ведут себя в растворе как ансамбль свободных молекул мицеллообразующих ПАВ.

Методом флуоресценции Nile Red была также исследована зависимость ККМ ГМ(18%)-НМ-хитозана от pH и концентрации соли. При pH = 6,5 значение ККМ снижается от 0,4 мг/мл (в отсутствие соли) до 0,25 мг/мл (0,5 М NaCl). Также как и для катионных ПАВ [40], это снижение ККМ может быть объяснено более сильной конденсацией противоионов при увеличении концентрации соли. Действительно, усиление конденсации отвечает менее значительной потере трансляционной энтропии и снижает свободную энергию мицеллообразования. Было также показано, что в отсутствие соли увеличение pH от 5,8 до 7,0, т.е. депротонирование аминогрупп приводит к снижению ККМ от 0,6 мг/мл до 0,25 мг/мл. Это снижение ККМ можно объяснить снижением заряда при депротонировании аминогрупп, что в свою очередь приводит с снижению потери трансляционной энтропии, свободной энергии мицеллообразования и ККМ.

Взаимодействие с модельными мембранами

Одним из ответственных этапов трансфекции является взаимодействие между комплексами ДНК/невирусный вектор и клеточными мембранами. Этот тип взаимодействия играет важную роль на всех этапах трансфекции, включая начальное взаимодействие между этими комплексами с мембранами плазмы, их высвобождение из эндосом и взаимодействия с мембраной ядра клетки. Поскольку ГМ-НМХ проявляют поверхностно-активные свойства, то нашей первоначальной целью было выяснение, взаимодействуют ли свободные молекулы этих хитозанов с мембранами и изменяют ли они свойства этих мембран. С этой целью мы изучили взаимодействие между ГМ(18%)-НМ-хитозаном и большими униламеллярными липосомами (LUV), которые моделировали клеточные мембраны. Ранее было показано, что нейтральные и анионные липосомы могут адекватно моделировать соответственно внешний и цитоплазмический слои мембраны плазмы [3—5, 33]. Таким образом, взаимодействие между молекулами ГМ(18%)-НМ-хитозана с липидными бислоями изучалось нами с использованием LUV, полученными из димистроилфосфатидилхолина (DMPC), фосфолипида цвиттер-ионного типа, в целом нейтрального, или из димистроилфосфатидилглицерина (DMPG), анионного фосфолипида. Это взаимодействие определялось по анизотропии флуоресценции меченого фосфолипида (DPHpPC) при термотропных фазовых переходах в этих LUV (рис. 5). Этот зонд, будучи сам фосфолипидом, встроен в мембрану и не имеет возможности ее покинуть (что обычно приводит к артефактам) даже в том случае, когда на внешней стороне мембраны образуются гидрофобные домены при взаимодействии хитозанов с липосомами.

Опыты проводились при постоянной концентрации липосом (200 мкМ фосфолипидов) и при различной концентрации ГМ-НМ-хитозанов. Липосомы, которые формировались из индивидуальных фосфолипидов, DMPC или DMPG, демонстрировали четкие фазовые переходы между гелевой L_β и жидкокристаллической L_α фазами при критических температурах (T_m), соответственно равных 25 и 27 °С. Отношение хитозан/фосфолипид *r* изменялось в пределах от 0,5 до 2, что отвечало концентрациям хитозанов ниже их ККМ. В присутствии ГМ(18%)-НМ-хитозана анионные липосомы на основе DMPG показывают слабый, но тем не менее заметный сдвиг температуры фазового перехода (ΔT_m = +3 °С), в то время как в случае нейтральных липосом на основе DMPC этот эффект был незначительным. Положительное значение ΔT_m в случае анионных липосом указывает на стабилизацию бислоя. Более того, мембрана становится более жесткой, по крайней мере в жидкокристаллической фазе, что следует из увеличения анизотропии флуоресценции в области температур выше T_m. Преимущественное взаимодействие ГМ-НМХ с анионными липосомами и эффект стабилизации их мембран указывает на то, что это взаимодействие обусловлено как электростатическим притяжением между положительно заряженными глюкозаминными группами и отрицательно заряженными полярными головками фосфолипидов, так и взаимодействием между встроенными в мембрану ТДЦ цепями хитозанов и гидрофобными группами фосфолипидов (рис. 6). Поскольку выигрыш энергии при переносе одной группы C_{14} из водной фазы внутрь гидрофобной области мембраны составляет порядка 10 *kT*, то можно предположить, что адсорбция ГМ(18%)-НМ-хитозана с его 4—5 ТДЦ группами на молекулу необратима.

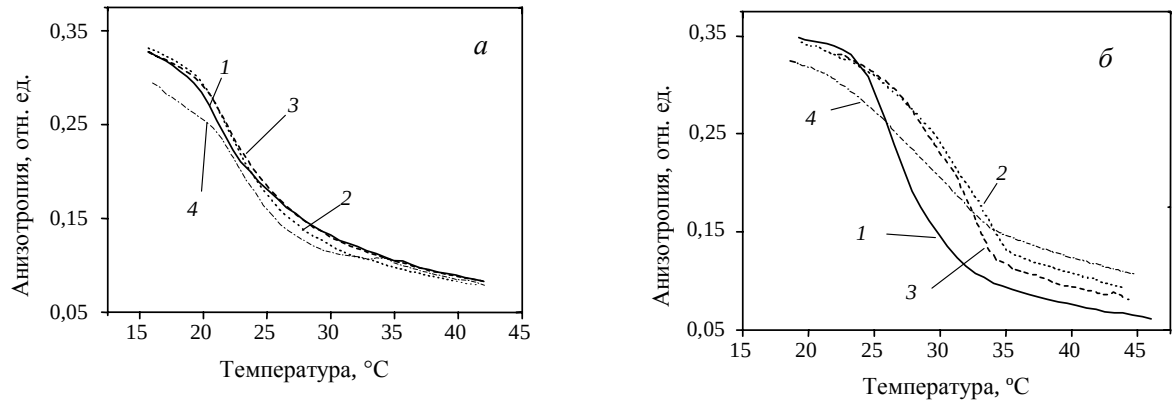


Рис. 5. Зависимость анизотропии флуоресценции 2-(3-дифенилгексатриенил)пропаноил-1-гексадеканоил-син-глицеро-3-фосфолипидов (DPHpPC) от температуры:

а — взаимодействие ГМ(18%)-НМ-хитозана с LUV, образованными DMPC и DMPG; *б* — концентрация липосом, выраженная в концентрации фосфолипидов 200 мкМ; фосфолипиды/DPHpPC = 100; молярное отношение фосфолипиды/хитозан (в мономерных единицах): *1* — 0, *2* — 0,25, *3* — 0,5; *4* — 1.

Из этих опытов следует, что ГМ-НМХ преимущественно должны взаимодействовать с внутренним слоем плазмидных мембран, а не с их внешним слоем. Ограниченное взаимодействие ГМ-НМХ с внешней стороной мембран благоприятно для их использования в генной терапии, поскольку сильное взаимодействие привело бы к диссоциации комплекса ДНК/ГМ-НМХ и помешало бы проникновению ДНК внутрь клетки, как это наблюдается в случае комплексов ДНК/ЦТАБ [3]. С другой стороны, взаимодействие вектора ДНК с анионными фосфолипидами, образующими внутренний слой мембраны цитоплазмической эндосомы, предположительно способно дестабилизировать эту мембрану, что приведет к отделению ДНК от вектора и попаданию в цитоплазму.

Перечисленные признаки считаются необходимыми условиями для эффективной трансфекции. Следовательно, ГМ-НМХ можно использовать в качестве векторов генов. Более того, необратимая адсорбция ГМ-НМХ на липидном бислое предположительно ограничивает как их латеральную подвижность, так и переходы типа «флип-флоп» по отношению к бислою. Это разительно отличается от большой подвижности и способности к «флип-флопам» адсорбированных на мембранах катионных ПАВ [3]. Поскольку эти свойства катионных ПАВ предположительно являются причиной их цитотоксичности, ГМ-НМХ проявляют слабую цитотоксичность. Слабая цитотоксичность ГМ-НМХ получила подтверждение в наших недавних опытах [46], в которых было показано, что их добавление к клеткам при обычно используемых концентрациях приводит к гибели менее 10% таких клеток.

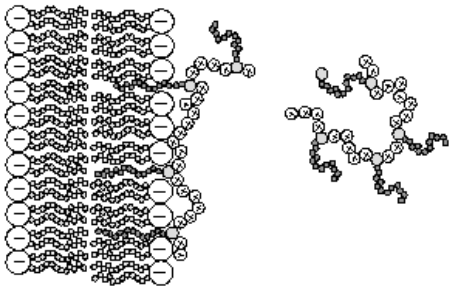


Рис. 6. Схема адсорбции молекулы ГМ(18%)-НМ-хитозана на поверхности бислойной липидной мембраны

Выводы

Получены гидрофобно-модифицированные низкомолекулярные хитозаны с молекулярной массой 5 кДа и степенью ацетилирования 3%(мол.), содержащие тетрадеценоильные (ТДЦ) группы в количестве 3—18%(мол.). Эти соединения относительно монодисперсны и в среднем содержат 25—30 глюкозаминных фрагментов и 1—5 ТДЦ групп на молекулу хитозана. Вследствие относительно низкого молекулярного веса и наличия карбоксильных групп, связанных с тетрадеценоильными группами, эти соединения хорошо растворимы в воде при нейтральных значениях pH. Поверхностная активность, т.е. способность снижать поверхностное натяжение у ГМ-НМ-хитозанов возрастает с ростом числа ТДЦ, в то время как критическая концентрация мицеллобразования снижается.

Было показано, что значения ККМ этих производных хитозанов, выраженные в объемной концентрации ТДЦ цепей, одинаковы для всех ГМ-НМХ и близки к значению ККМ для ЦТАБ, что указывает на то, что молекулы ГМ-НМХ ведут себя в растворе как ансамбль свободных молекул мицеллообразующих ПАВ. Более того, это подтверждает общепринятое представление о незначительном вкладе электростатического отталкивания в свободную энергию мицеллообразования [44]. Действительно, образование мицелл определяется балансом между выигрышем в свободной энергии в результате гидрофобного взаимодействия между алкильными цепями в ядре мицеллы и потерей трансляционной энтропии свободных ПАВ и противоионов. В данном случае снижение ККМ с ростом pH и концентрации соли связано преимущественно с потерей трансляционной энтропии макроионов ГМ-НМ-хитозанов, обусловленной снижением эффективного заряда глюкозаминных групп.

ГМ-НМХ взаимодействуют с отрицательно заряженными липидными липосомами, моделирующими внут-

ренний слой плазмидных мембран. Снижение флюидности (увеличение жесткости) липосомных мембран в жидкокристаллическом фазовом состоянии в результате взаимодействия с ГМ-НМ-хитозанами можно объяснить включением ТДЦ цепей, ковалентно связанных с глюкозаминными группами в липидный бислой, образованный алкильными группами фосфолипидов. В отличие от катионных ПАВ, в случае ГМ-НМХ возникают затруднения для их латеральной и трансверсальной диффузии по отношению к мембранам, что объясняет их низкую токсичность. Кроме того, преимущественное взаимодействие ГМ-НМХ с внутренним слоем биомембран приводит к дестабилизации эндосомальных мембран, что способствует высвобождению ДНК в цитоплазму. В целом, полученные результаты показывают, что ГМ-НМХ обладают интересными свойствами, позволяющими рассматривать их как потенциальные невирусные векторы трансфекции ДНК. Результаты исследования физико-химических свойств комплексов этих хитозанов с ДНК, а также эффективности их трансфекции как *in vitro*, так и *in vivo* будут опубликованы [46].

Работа была выполнена при поддержке французского Агентства против миопатии (AFM) и программы Эко-Нет (Eco-Net) Министерства иностранных дел Франции в рамках сотрудничества между Францией, Российской Федерацией и Украиной. В. Бабак работал приглашенным профессором в Университете Луи Пастера. Авторы благодарят доктора C. Grandfils из Института химии Льежского университета (Бельгия) и проф. J. Desbrières из лаборатории физикохимии полимеров Университета в г. По (Франция) за помощь в характеристике образцов НМ-хитозанов методами ПМР и эксклюзионной хроматографии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Xu Y., Szoka C F.* Biochemistry, 1996, v. 35, p. 5616—5623.
2. *Mel'nikov S.M., Sergeyev V.G., Yoshikawa K.* J. Am. Chem. Soc., 1995, v. 117, p. 2401—2408.
3. *Clamme J.-P., Bernacchi S., Vuilleumier C., Duportail G., Mély Y.* Biochim. Biophys. Acta, 2000, v. 1467, p. 347—361.
4. *Llères D., Dauty E., Behr J.P., Mély Y., Duportail G.* Chem. Phys. Lipids, 2001, v. 111, p. 59—71.
5. *Llères D., Clamme J.-P., Dauty E., Blessing T., Krishnamoorthy G., Duportail G., Mély Y.* Langmuir, 2002, v. 18, p. 10340—10347.
6. *Sasaki T., Kawai K., Saijo-Kurita K., Ohno T.* Toxicol. in vitro, 1992, v. 6, p. 451—457.
7. *Muzzarelli R.A.A.* In: Chitosan in Natural Chelating Polymers; Alginic acid, Chitin, and Chitosan. Ed. R. Belcher. Oxford: Pergamon Press, 1973, p. 144—176.
8. *Muzzarelli R.A.A.* Carbohydr. Polym., 1996, v. 29, p. 309.
9. *Romoren K., Thu B.J., Evensen O.* J. Controlled Release, 2002, v. 85, p. 215—225.
10. *Borchard G.* Adv. Drug Delivery Rev., 2001, v. 52, p. 143—150.
11. *Rolland A.P.* Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 1998, v. 15, p. 143—198.
12. *Sato T., Ishii T., Okahata Y.* Biomaterials, 2001, v. 22, p. 2075—2080.
13. *Venkatesh S., Smith T.J.* Biotechnol. Appl. Biochem., 1998, v. 27, p. 265—267.
14. *Cui Z., Mumper R.J.* J. Controlled Release, 2001, v. 75, p. 409.
15. *Illum L., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M., Fisher A.N., Davis S.S.* Adv. Drug Delivery Rev., 2001, v. 51, p. 81—96.
16. *Hejazi R., Amiji M.* J. Controlled Release, 2003, v. 89, p. 151—165.
17. *Fang N., Chan V., Mao H.-Q., Leong K.W.* Biomacromolecules, 2001, v. 2, p. 1161—1168.
18. *Mansouri S., Lavigne P., Corsi K., Benderdour M., Beaumont E., Fernandes J.C.* Eur. J. Pharm. Biopharm., 2004, v. 57, p. 1—8.
19. *Corsi K., Chellat F., Yahia L., Fernandes J.C.* Biomaterials, 2003, v. 24, p. 1255—1264.
20. *Erbacher P., Zou S., Bettinger T., Steffan A.-M., Rémy J.-S.* Pharm. Res., 1998, v. 15, p. 1332—1339.
21. *Rinaudo M., Pavlov G., Desbrières J.* Polymer, 1999, v. 40, p. 7029—7032.
22. *MacLaughlin F.C., Mumper R.J., Wang J., Tagliaferri J.M., Gill I., Hinchcliffe M., Rolland A.P.* J. Controlled Release, 1998, v. 56, p. 259—272.
23. *Koping-Hoggard M., Mel'nikova Y.S., Varum K.M., Lindman B., Artursson P.* J. Gene. Med., 2003, v. 5, p. 130—141.
24. *Lee M., Nah J.-W., Kwon Y., Koh J.J., Ko K.S., Kim S.W.* Pharm. Res., 2001, v. 18, p. 427—431.
25. *Thanou M., Florea B.I., Geldof M., Junginger H.E., Borchard G.* Biomaterials, 2002, v. 23, p. 153—159.
26. *Tommeraas K., Varum K.M., Christensen B.E., Smidsrod O.* Carbohydr. Res., 2001, v. 333, p. 137—144.
27. *Tikhonov V.E., Stepnova E.A., Babak V.G. e. a.* Carbohydr. Polym., 2006, v. 64, p. 66—72.
28. *Hirano S., Ohe Y., Ono H.* Carbohydr Res., 1976, v. 47, p. 315—320.
29. *Domard A., Carter N.* In: Chitin and Chitosan. Eds. G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, P. Sandford. London—New York: Elsevier Applied Science, 1989, pp. 383—387.
30. *Rinaudo M., Dung P.L., Gey C., Milas M.* Int. J. Biol. Macr., 1992, v. 14, p. 121—128.
31. *Brugnerotto J., Desbrières J., Roberts G., Rinaudo M.* Polymer, 2001, v. 42, p. 9921—9927.
32. *Countinho P.J.G., Castanheira E.M.S., Rei M.C., Oliveira M.E.C.D.R.* J. Phys. Chem. B, 2002, v. 106, p. 12841—12846.
33. *Cullis P.R., Hope M.J.* In: Biochemistry of Lipids and Membranes. Eds. D.E. Vance, J.E. Vance. New York: Benjamin/Cummings, 1985, pp. 27—72.
34. *Richardson S.C.W., Kolbe H.V.J., Duncan R.* Int. J. Pharm., 1999, v. 178, p. 231—243.
35. *Tanford C.* The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. New York: Wiley, 1973, p. 10.
36. *Babak V.G., Desbrières J., Tikhonov V.E.* Colloid. Surf. A, 2005, v. 255, p. 119—130.
37. *Rosen M.J.* Surfactants and Interfacial Phenomena. 2-nd ed. New York: J.Wiley & Sons,, 1989.
38. *Babak V.G., Pavlov A.N., Svitova T.F., Danilenko A.N., Egorov V.V., Varlamova E.A.* Kolloid. Zhurn., 1996, v. 58, p. 1—8.
39. *Chakraborty T., Ghosh S., Moulik S.P.* J. Phys. Chem. B, 2005, v. 109, p. 14813—14823.
40. *Konop A.J., Colby R.H.* Langmuir, 1999, v. 15, p. 58—65.
41. *Lee K.Y., Jo W.H., Kwon I.C., Kim Y.-H., Jeong S.Y.* Langmuir, 1998, v. 14, p. 2329—2332.
42. *Zana R.* J. Colloid Interf. Sci., 1980, v. 78, p. 330—337.
43. *Nagamine N., Nakamura H.* Anal. Sci., 1998, v. 14, p. 405—406.
44. *Murray R.C., Hartley G.S.* Trans. Faraday Soc., 1935, v. 31, p. 183—189.
45. *Attwood D., Florence A.T.* Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology. New York: Chapman and Hall, 1983, p. 203.
46. *Zhang X., Ercelen S., Duportail G., Schaub E., Tikhonov V., Slita A., Zarubaev V., Babak V., Mély Y.* J. Gene Med., 2007 (sent)