

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.03.02 Физика

Профиль: Физика

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ПОДВИЖНОСТИ И ФАЗОВОГО ПОВЕДЕНИЯ
СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ЛИПИДА, ПЛЮРОНИКА И КУРКУМИНА
МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Студент 4 курса группы 06-711

«20» июня 2021 г.

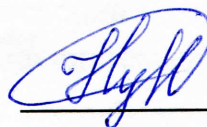


(Созонова Д.А.)

Научный руководитель

к.ф.- м.н., доцент

«20» июня 2021 г.



(Халиуллина А.В.)

Научный консультант

д.ф.-м.н., профессор

«20» июня 2021 г.

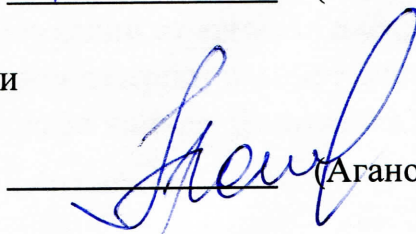


(Филиппов А.В.)

Заведующий кафедры медицинской физики

д.х.н., профессор

«20» июня 2021 г.



(Аганов А.В.)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	5
1.1 Системы доставки лекарственных средств на основе липосом, стабилизированных полимерными молекулами	5
1.1.1 Строение липосом, их свойства и классификация	5
1.1.2 Строение и свойства плуроников, особенности взаимодействия с липосомами.....	8
1.1.3 Липосомы, модифицированные плуроником как средство доставки куркумина	11
1.2 Ядерный магнитный резонанс	13
1.2.1 Понятие самодиффузии.....	16
1.2.2 Понятие химического сдвига. Анизотропия химического сдвига	18
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	22
2.1 Основные принципы измерения T_2	22
2.2 Измерения коэффициентов самодиффузии методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля	23
2.3 Оптическая микроскопия и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.....	24
2.4 Характеристики используемой аппаратуры и условия измерений.....	26
2.5 Объекты исследования.....	26
2.6 Методика приготовления образцов.....	28
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	30
3.1 Исследование фазового поведения систем на основе липида, плуроника и куркумина по данным ^{31}P ЯМР спектроскопии.....	30
3.2 ЯМР спектроскопия ^1H в исследовании систем на основе липида, плуроника и куркумина	33
3.3 Исследование поперечной ЯМР релаксации на ядрах ^1H в системах на основе липида, плуроника и куркумина	36
3.4 Температурные зависимости времен поперечной релаксации	41
3.5 Форма диффузионных затуханий в липид-полимерных системах	46
3.6 Зависимость формы диффузионных затуханий от времени диффузии	51
3.7 Оптическая микроскопия и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в исследовании систем на основе липида, плуроника и куркумина.....	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	56
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	58

ВВЕДЕНИЕ

Поиск лучшего способа доставки лекарственного средства до органов-мишеней является одной из актуальных задач современной медицины. Липосомы с бислоем из фосфолипидов нашли широкое применение из-за их хорошей биосовместимости с организмом, полной биодegradации и не токсичности. Однако они нестабильны при воздействии ферментов в среде желудочно-кишечного тракта. Это приводит к снижению усвоения перорально вводимых лекарственных веществ и представляет собой проблему практического применения обычных липосом. Поэтому сейчас для доставки лекарств используют липосомы, модифицированные полимерами. При этом стабильность и устойчивость липосом увеличилась [1]. В качестве полимера могут выступать плуроники – триблок-сополимеры состоящие из звеньев полиоксиэтилена (ПЭО) и пропиленоксида (ППО) [2].

Объектом исследования в данной работе являлись липосомы из липидов (фосфатидилхолина) с плуроником F-127, содержание куркумин. Куркумин – биологически активная молекула, обладающая противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами. Однако существуют сложности в доставке куркумина к биологическим мишеням в организме, обусловленные плохой растворимостью в воде и низкой биодоступностью, что приводит к неоправданно большому расходу лекарственного вещества при малом усвоении [3]. Эти проблемы в доставке куркумина можно решить, используя липосомы из липидов (фосфатидилхолина) с плуроником F-127[1].

Цель данной работы – исследование особенностей молекулярной подвижности и фазового поведения систем на основе липида (фосфатидилхолина), плуроника F-127 и куркумина методом ЯМР на ядрах ^{31}P и ^1H при варьировании температуры и концентрации куркумина.

Задачи работы:

- Исследование фазовых структур на основе липида, плюроника и куркумина различной концентрации методом ^{31}P ЯМР спектроскопии при варьировании температуры;
- Определение времен поперечной ядерной магнитной релаксации на ядрах ^1H в системах на основе липида, плюроника и куркумина при варьировании температуры и концентрации куркумина;
- Исследование особенностей трансляционной подвижности систем на основе липида, плюроника и куркумина различной концентрации методом ^1H ЯМР диффузометрии;
- Исследование морфологии систем на основе липида, плюроника и куркумина методами оптической микроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Системы доставки лекарственных средств на основе липосом, стабилизированных полимерными молекулами

1.1.1. Строение липосом, их свойства и классификация

Липосомами называют искусственно созданные везикулы, которые могут состоять из одинарной или многих липидных бимолекулярных мембран (мультиламеллярные везикулы). Липиды – это соединения, которые состоят из полярной головки и неполярной углеводородной цепи (рисунок 1а). Они являются амфифильными соединениями, то есть обладают гидрофобными и гидрофильными свойствами одновременно. Благодаря этому они могут образовывать липидный бислой в воде. Пример такого бислоя в воде приведен на рисунке 1б. Фосфолипид – это липид, содержащий остаток фосфорной кислоты в полярной головке. Гидрофобные части молекул (неполярные цепи) фосфолипидов стремятся избежать контакта с водой перестраиваясь таким образом, что по итогу происходит замыкание бислоя самого на себя. Это один из способов образования везикул [4].

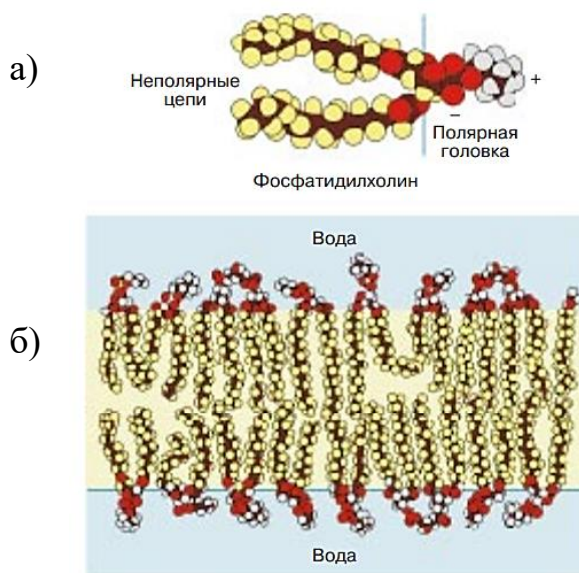


Рисунок 1 а) – молекула фосфатидилхолина;
б) – бислой из молекул липидов (фосфатидилхолин) [4]

Одними из самых распространенных молекул клеточных мембран являются фосфатидилхолины – группа фосфолипидов, в состав которых

входит холин. На рисунке 2 изображена фазовая диаграмма системы яичный лецитин (фосфатидилхолин) – вода.

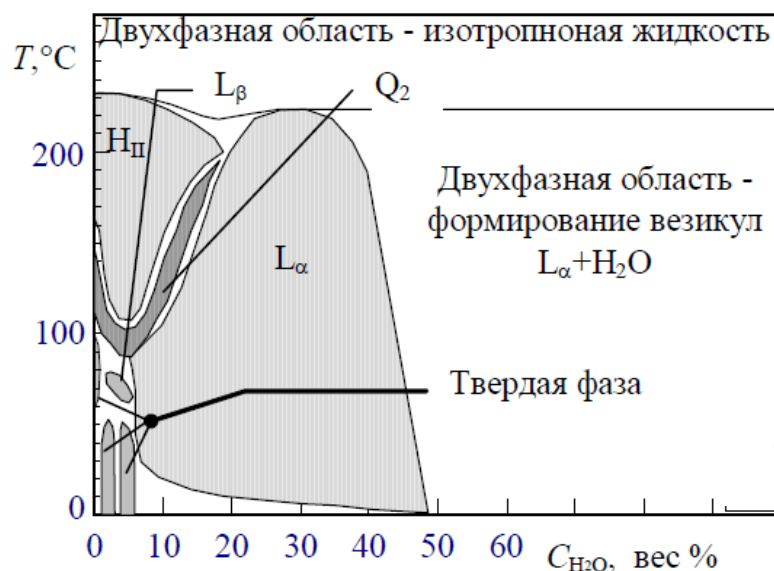


Рисунок 2 – Диаграмма зависимости фазы водно-фосфолипидной системы от температуры и концентрации [5]

Как можно увидеть фазовые состояния в образце лецитин-вода отличаются в зависимости от величин температуры и концентрации. Область L_α – это ламеллярная жидкокристаллическая мезофаза, образованная параллельно расположенными бимолекулярными слоями. При комнатной температуре в этой фазе находятся образцы с концентрацией лецитина от 7 до 35% и с содержанием воды 9 – 45% и это состояние фазы в запаянных ампулах сохраняется до 220-240°C. Если содержание воды выше 45%, то мезофаза L_α расслаивается на L_α и водный раствор. Это – двухфазная область (формирования липосом и везикул). Области с L_β , H_{II} и Q_2 относятся к случаю, когда содержание воды мало (10%) и называются ламеллярной, гексагональной и кубической жидкокристаллическими мезофазами соответственно [5].

По размеру липосомы делятся на моноламеллярные везикулы – их диаметр от 20 нм (оболочка состоит из одного бислоя) и мультиламеллярные везикулы – диаметр до 10-50 мкм (оболочка включает десяток или сотню бислоев). На рисунке 4 представлены схематично изображенные виды липосом отличных по размеру, форме и количеству бислоев [4].

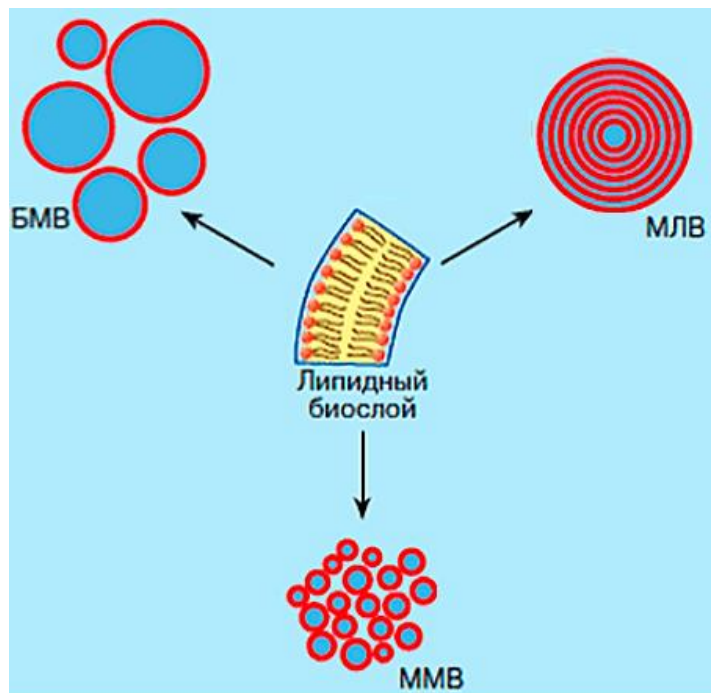


Рисунок 4 – Классификация липосом

Большие моноламеллярные везикулы (БМВ) – это везикулы с диаметром более 100 нм, чья оболочка состоит из одного липидного бислоя. Мультиламеллярные везикулы (МЛВ) – это частицы, которые могут состоять как от нескольких десятков до сотен липидных бислоев, между которыми находится вода. Их размеры относительно велики – примерно 50 нм. Малыми моноламеллярными везикулами (ММВ) называются липосомы, образованные одним липидным бислоем с диаметром около 20 нм [4].

Липосомы широко применяются в современной медицине как носители биологических и фармакологических соединений для направленной доставки благодаря структуре фосфолипидного бислоя [4]. На рисунке 5 представлены виды липосом в зависимости от разделения по механизму доставки лекарства к клетке-мишени.

Вариант А – стандартная липосома из фосфолипидов. Подобные липосомы нестабильны в крови и подвержены разрушительному действию ферментов в среде желудочно-кишечного тракта. Это приводит к неэффективности перорального приема лекарственных средств [1,5].

Вариант В – липосома стерически стабилизированная полимерными молекулами. Она представляет собой везикулу, в бислое которой как бы

внедрены молекулы полимера. Такая оболочка способствует длительной циркуляции частицы в кровеносном русле. В частности полимером, который используют для создания стерически стабилизированных липосом, является полиэтиленгликоль (ПЭГ). Такие липосомы продемонстрировали хорошую доставку лекарственного средства и увеличение времени циркуляции липосом в кровеносном русле (рисунок 5В). Система ПЭГ–липосома хорошо зарекомендовала себя, однако ПЭГ зачастую вызывает аллергические реакции [6]. По этой причине поиск менее токсичной и более совершенной альтернативы ПЭГ продолжаются. В качестве альтернативы ПЭГ могут быть использованы плуроники. Рассмотрим этот класс соединений подробнее.

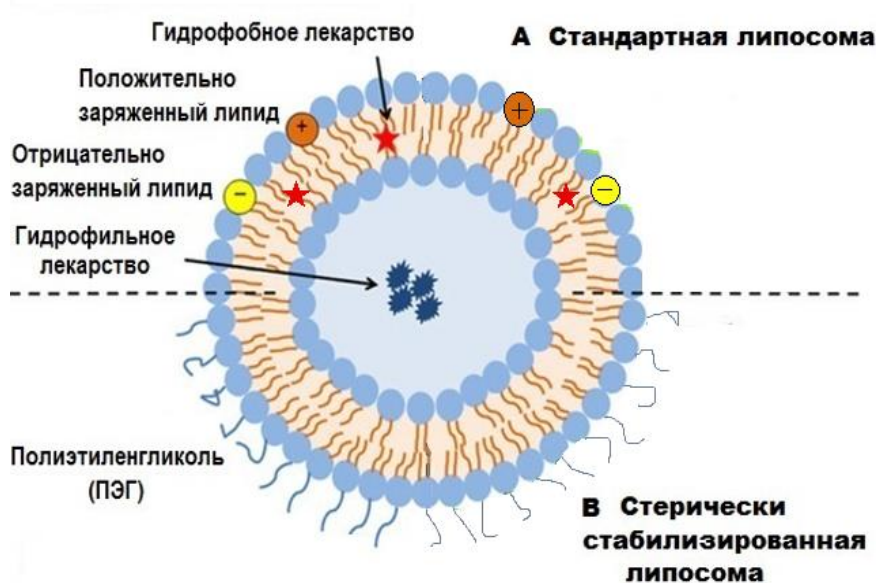


Рисунок 5 – Виды липосом в зависимости от разделения по механизму доставки лекарства в клетку [6]

1.1.2 Строение и свойства плуроников, особенности их взаимодействия с липосомами

Плуроники (полоксомеры) – водорастворимые неионогенные блок-сополимеры, состоящие из звеньев полиоксиэтилена (ПЭО) и пропиленоксида (ППО). В качестве примера на рисунке 6 приведена структурная формула плуроника F127.

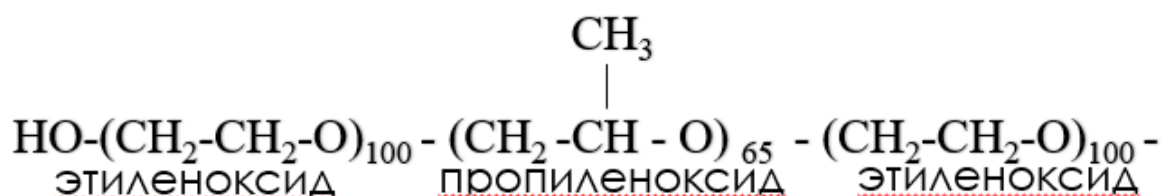


Рисунок 6 – Структурная формула плуроника F127.

Плюроники обладают более низкой токсичностью и лучшей совместимостью с лекарственными препаратами [7]. Плюроники в водном растворе проявляют амфифильный характер – звенья ПЭО растворимы в воде (гидрофильны), а ППО – нерастворимы (гидрофобны). Плюроникам присущи такие общие свойства, как малая гигроскопичность и химическая устойчивость к воздействию кислот и щелочей [8].

В водных растворах плюроники, в определенном диапазоне концентраций и температур, образуют сферические мицеллы. Ядро таких мицелл состоит из гидрофобных блоков ППО, а корона – из гидрофильных блоков ПЭО (рисунок 7).

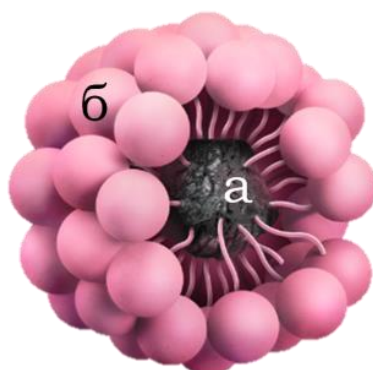


Рисунок 7 – Структура мицеллы, где а-ядро, б-корона мицеллы [8]

На рисунке 8 приведена фазовая диаграмма для раствора плуроника F-127 в воде. Подвижная золь фаза содержит унимеры (отдельные молекулы плуроника) и мицеллы. При увеличении концентрации плуроника до критической концентрации мицелообразования (ККМ) и (или) с увеличением температуры до критической температуры мицелообразования (КТМ) в растворе образуются устойчивые мицеллы [9]. Если продолжить увеличивать концентрацию плуроника в растворе происходит перекрывание мицеллярных оболочек – это приводит к объединению мицелл в

квазикристаллическую решетку геля. Гель – это студенистая субстанция, обладающая свойствами как твердого тела, так и жидкости. Гель способен сохранять форму, обладает упругостью и эластичностью [10]. Мицеллы могут упаковываться в гранецентрированные кубические структуры – жесткий гель или в объемно-центрированные кубические структуры – мягкий гель в зависимости от концентрации плуроника и температуры.

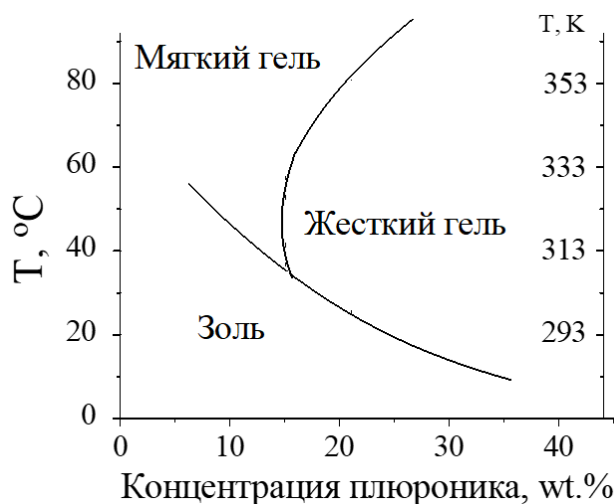
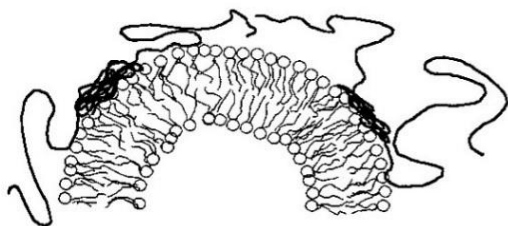


Рисунок 8 – Фазовая диаграмма для раствора плуроника F-127 в воде

Особенности взаимодействия плуроников с липосомами

Возможны два варианта включения плуроника в липидный бислой: плуроник адсорбируется на поверхности липосомы (рисунок 9А) или он непосредственно включен в липидный бислой (рисунок 9В). В первом случае плуроник добавляют уже к сформированным моноламеллярным липосомам, а для варианта 9В – плуроник участвует в образовании малых моноламеллярных везикул с самого первого этапа приготовления – вместе с липидами.

(А) Плуроник, адсорбированный на поверхности липосомы



(В) Плуроник, включенный в липидный бислой липосомы

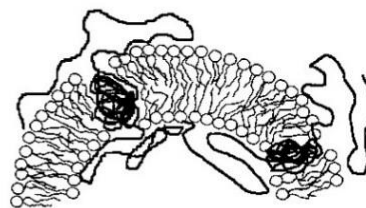


Рисунок 9 – Примеры включения плуроника в липосому [4]

Для получения случая, приведенного на рисунке 9А плуроник добавляют уже к сформированным моноламеллярным липосомам, а для варианта 9В – плуроник участвует в образовании малых моноламеллярных везикул с самого первого этапа приготовления – вместе с липидами.

Липосомы со встроенным плуроником (рисунок 9В) показали относительно высокую эффективность клеточного поглощения и улучшенную способность проникать через слизистую оболочку кишечника по сравнению с адсорбированными липосомами (рисунок 9А) [11]. Поэтому именно этот способ включения плуроника в липосому используется в этой работе.

1.1.3. Липосомы, модифицированные плуроником как средство доставки куркумина

В качестве модели лекарственного вещества в работе использовался куркумин, обладающий противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами.

На рисунке 10 приведена структурная формула куркумина. Это лекарственное вещество обладает свойствами, которые могут помочь в борьбе с раковыми клетками [3]. Куркумин способен снижать воспаление и защищать клетки. В дополнение он является мощным антиоксидантом, так же куркумин борется с свободными радикалами в теле, которые повреждают клетки. Такие свойства куркумина помогают увеличивать сопротивление клеток инфекциям и злокачественным опухолям и делают его использование актуальным в медицине [1].

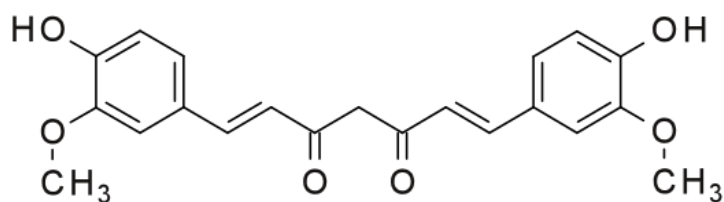


Рисунок 10 – Структура куркумина

К сожалению, существует ряд трудностей в применении куркумина на практике из-за его быстрой деградации в нейтральной и щелочной среде, низкой биодоступности и плохой растворимости в воде [12]. Использование системы доставки пльороник–липид может решить эти проблемы.

В работе исследовалась [1] инкапсуляция куркумина 2,5 моль% в липосому стабилизированную пльороником. В результате система липосома-пльороник продемонстрировала более медленную скорость высвобождения куркумина по сравнению с обычной липосомой, нагруженной куркумином. Высвобождение куркумина из липосом может зависеть от взаимодействия между куркумином и бислоем – чем сильнее взаимодействие, тем медленнее высвобождение куркумина из липосом. При модификации липосом пльороником гидрофобный ППО блок пльороника обеспечивает основное взаимодействие между куркумином и бислоем, таким образом модификация пльороником может замедлить высвобождение куркумина из липосом. Использование системы липосома-пльороник улучшает стабильность куркумина в слабощелочных условиях, так же эта система продемонстрировала лучшую термическую стабильность чем обычные липосомы. При этом липосомы, модифицированные пльороником так же показали превосходную биологическую доступность.

Таким образом использование в доставке куркумина липосом, модифицированных пльороником, имеет большие преимущества по сравнению с доставкой куркумина обычными липосомами.

1.2 Ядерный магнитный резонанс

Явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – это явление, которое заключается в резонансном испускании или поглощении электромагнитной энергии системой спинов, находящихся во внешнем магнитном поле [13]. Разберем это явление на примере классической модели, которая описывает поведение магнитных моментов ядер μ_i со спинами $I_i=1/2$ в постоянном магнитном поле B_0 . Введем лабораторную систему координат, в которой

вектор постоянного магнитного поля \mathbf{B}_0 направлен по вертикальной оси z лабораторной системы координат (рисунок 12).

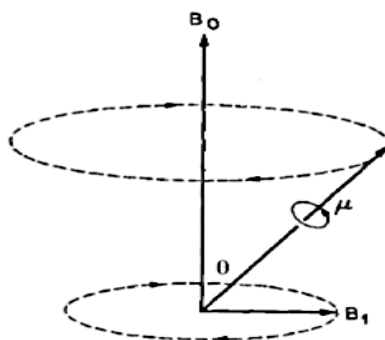


Рисунок 12 – Расположение полей \mathbf{B}_0 , и \mathbf{B}_1 в лабораторной системе координат и прецессия вектора μ_i в магнитном поле \mathbf{B}_0 .

При помещении системы спинов в магнитное поле, каждый спин принимает одну из двух возможных ориентаций: с высокой энергией (μ_i антипараллелен \mathbf{B}_0) и низкой энергией (μ_i ориентирован по полю \mathbf{B}_0). В случае воздействия на такую систему радиочастотного поля \mathbf{B}_1 , вектор которого всегда локализуется в плоскости xu , с энергией кванта $h\nu_0 = \Delta E$ (где ν_0 – резонансная частота, ΔE – это разность энергий), произойдет поглощение этого кванта. То есть осуществится переход системы с низкого энергетического уровня на более высокий и именно это поглощение может быть зарегистрировано. Все это составляет основу спектроскопии ЯМР [14].

Сумма всех векторов намагниченности всех спинов – это величина, которая носит название макроскопической намагниченности \mathbf{M} [14].

Можно добиться отклонения \mathbf{M} на любой угол подбирая длительность воздействия поля \mathbf{B}_1 . При воздействии 90° -м радиочастотным импульсом (р.ч.) \mathbf{M} станет перпендикулярным к направлению \mathbf{B}_0 . В этом случае в приемно-передающей катушке возникнет сигнал свободой индукции с амплитудой A_0 . Эта амплитуда является убывающей функцией, так как макроскопическая намагниченность \mathbf{M} в итоге релаксирует к своему первоначальному значению (рисунок 13).

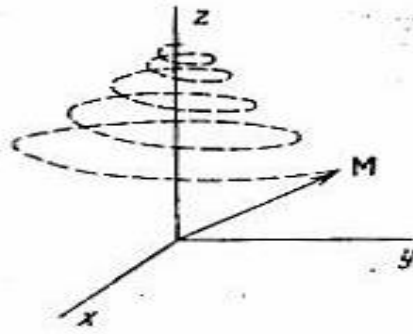


Рисунок 13 – Прецессия вектора M при релаксации.

Различают два вида релаксации [13, 14]: спин-решеточная релаксация с временной константой T_1 – это релаксация продольной составляющей M_z к равновесному значению M , в результате взаимодействия возбужденных ядерных спинов с его окружением (решеткой); спин-спиновая релаксация – изменение поперечной составляющей M за время T_2 из-за необратимой потери фазовой когерентности между векторами магнитных моментов ядер [13].

Для измерения T_1 обычно используется радиочастотная (р.ч.) последовательность $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ с разными временами между двумя последовательными импульсами τ . В результате этого можно найти скорость спада M_z . Количественно спад описывается уравнениями Блоха при $M_x = M_y = 0$:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{-(M_z - M_0)}{T_1}, \text{ где } M_0 = |M|. \quad (1)$$

Интегрируем с начальными условиями $M_z = -M_0$ при $t=0$ и получаем:

$$M_z = M_0[1 - 2\exp(-t/T_1)]. \quad (2)$$

Но на практике используется выражение, приведенное ниже:

$$A_\tau = A_\infty(1 - 2\exp(-t/T_1)) \quad (3)$$

$$\ln(A_\infty - A_\tau) = \ln 2A_\infty - \tau/T_1, \quad (4)$$

где A_τ – начальная амплитуда индуцированного сигнала после 90-го импульса, приложенного в момент τ , а A_∞ – предельное значение A_τ при очень длительном интервале между 180 и 90 импульсами. Время T_1 определяется по наклону графика зависимости $\ln(A_\infty - A_\tau)$ от τ [13].

Измерение же времени спин-спиновой релаксации T_2 происходит методом спинового эхо. Этот метод представляет собой метод, при котором вектор M поворачивается относительно B_0 при действии 90-м р.ч. импульсом на 90 градусов, и его проекция на плоскость $xу$ становится равной M_{xy0} . Далее вектор суммарной намагниченности начинает расфазировываться [13, 14]. С увеличением времени от начала расфазировки увеличивается и фазовая разница между m_i -ми векторами намагниченности. В момент времени τ прикладывается 180-й импульс, что приводит к принудительной фазировке всех m_i к моменту времени 2τ . В этот момент происходит нарастание сигнала свободной индукции до максимума. Но из-за процессов поперечной релаксации, все m_i спадают в течение времени 2τ с временным коэффициентом T_2 , а начальная величина поперечной намагниченности меняется по экспоненциальному закону [13, 14]:

$$M_{xy} = M_{xy0} e^{-t/T_2}. \quad (5)$$

Запись спектра в ЯМР-спектрометрах происходит с помощью Фурье-преобразования спада сигнала свободно прецессирующих магнитных моментов ядер, после их возбуждения радиочастотным импульсом. Фурье-преобразование – это математическая процедура разложения сигнала на частотные гармоники [14]. На рисунке 14 приведено схематичное изображение Фурье-преобразования.

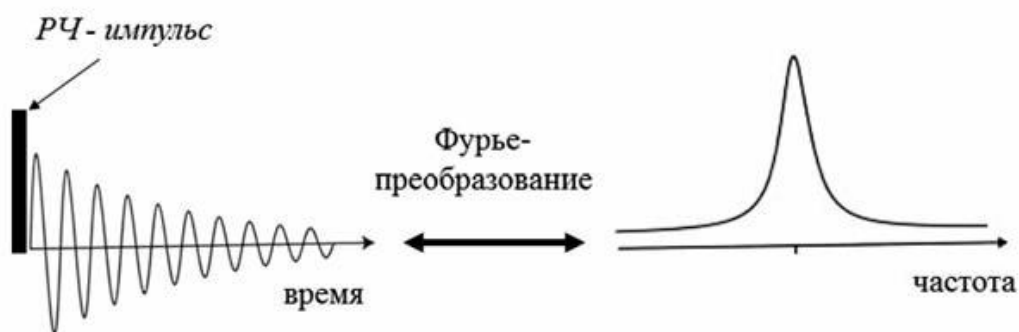


Рисунок 14 – Схематическое представление Фурье-преобразования

1.2.1 Понятие самодиффузии

Самодиффузия представляет собой явление пространственного перемещения в термодинамически равновесной среде в результате хаотического теплового движения [15].

Математический объект, который описывает движения молекул при самодиффузии называется пропагатором $P(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0, t)$ (или функцией Грина). Пропагатор является плотностью условной вероятности нахождения центра масс молекулы в точке с r , если в начальный момент времени центр масс находился в точке r_0 . Вид пропагатора описывается нормальным распределением Гаусса при таких временах t , которые меньше наибольшего из существующих времен корреляции τ_{\max} :

$$P(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0, t) = \frac{1}{4\pi D_s t^{3/2}} \exp \left\{ -\frac{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_0|^2}{4D_s t} \right\}. \quad (6)$$

При условии $t \gg \tau_{\max}$ режим движения молекул именуют диффузионным, а связанные с ним перемещения молекул – самодиффузией. Параметр D_s – коэффициентом самодиффузии (КСД) молекул. Величина КСД – это один из важнейших динамических параметров трансляционного движения [15].

С помощью $P(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0, t)$ можно записать уравнение Эйнштейна:

$$\langle [\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}_0]^2 \rangle = 6D_s t. \quad (7)$$

Благодаря этому уравнению можно рассчитать среднеквадратичное смещение молекулы за время t .

Общего алгоритма, для вычисления D_s и τ_{\max} не существует, но эти величины связаны с автокорреляционной функцией скорости $\langle \mathbf{v}(t) \cdot \mathbf{v}(0) \rangle$, где \mathbf{v} – вектор скорости центра масс [15].

$$\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}_0 = \int_0^t \mathbf{v}(\tau) d\tau. \quad (8)$$

Возведя в квадрат и произведя статистическое усреднение, учитывая стационарность корреляционной функции, получим:

$$\langle [\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}_0]^2 \rangle = 2 \int_0^t (t - \tau) \langle \mathbf{v}(t) \cdot \mathbf{v}(0) \rangle d\tau. \quad (9)$$

При диффузионном режиме движения, выражение (9) преобразуется:

$$\langle [\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}_0]^2 \rangle = 2t \int_0^\infty \langle \mathbf{v}(t) \cdot \mathbf{v}(0) \rangle dt. \quad (10)$$

Сравнивая соотношение (10) и уравнение Эйнштейна получили:

$$D_s = \frac{1}{3} \int_0^\infty \langle \mathbf{v}(t) \cdot \mathbf{v}(0) \rangle dt. \quad (11)$$

На практике для определения коэффициента самодиффузии D_s часто применяется соотношение Эйнштейна-Стокса, которое является следствием уравнения Ланжевена в классической теории броуновского движения. Оно связывает D_s с коэффициентом трения f [15]:

$$D_s = \frac{kT}{f}, \quad (12)$$

где k – константа Больцмана, T – температура.

Например, для жесткой непроницаемой сферической молекулы радиуса R , движущейся в жидкости с вязкостью η :

$$f = 6\pi\eta R. \quad (13)$$

Из выражений (12) и (13) мы получили формулу формула Стокса-Эйнштейна. Она используется для расчёта коэффициента самодиффузии для сферической частицы, участвующей в броуновском движении [15].

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}, \quad (14)$$

1.2.2 Понятие химического сдвига. Анизотропия химического сдвига

Химический сдвиг – это сдвиг резонансной частоты в зависимости от химического состава вещества, вызванный экранированием внешнего магнитного поля \vec{B}_o электронными оболочками ядер [16].

Локальное поле \vec{B}_{loc} , определяется выражением:

$$\vec{B}_{loc} = \vec{B}_o \cdot (1 - \sigma), \quad (15)$$

где σ – константа экранирования. Гамильтониан химического сдвига:

$$\hat{H}_{cs} = -\gamma \vec{B}_o \vec{\sigma} \hat{I}, \quad (16)$$

где \hat{I} – спиновый оператор, γ – гиромагнитное отношение ядра, $\vec{\sigma}$ – тензор анизотропии химического сдвига (АХС).

В общем случае распределение электронов вокруг ядра в молекуле не является сферически симметричным. Тогда величина экранирования σ и величина электронного тока вокруг поля \vec{B}_o будут зависеть от ориентации молекулы в поле, поэтому экранирующее свойство, связанное с ядром, должно быть описано тензором второго ранга $\vec{\sigma}$ [16].

Тензор анизотропии химического сдвига $\vec{\sigma}$ в декартовой системе координат является матрицей 3×3 :

$$\vec{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix}, \quad (17)$$

где x, y, z – некоторый неопределенный осевой базис.

Гамильтониан экранирующего взаимодействия, если приложенное магнитное поле \vec{B}_o направлено вдоль оси z преобразуется к виду:

$$\hat{H}_{cs} = -\gamma \vec{B}_o \sigma_{zz}^{lab} \hat{I}_z, \quad (18)$$

где z – ось лабораторной системы координат.

Тензор химического сдвига удобнее выражать в системе координат, в которой он является диагональным, например, в системе координат главных осей (PAS от «Principle Axis System»). В этой системе координат, тензор АХС $\vec{\sigma}$ принимает вид:

$$\vec{\sigma}_{PAS} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz} \end{pmatrix}, \quad (19)$$

где $\sigma_{xx}, \sigma_{yy}, \sigma_{zz}$ – главные компоненты тензора АХС.

Так как для оператора углового момента не существенно преобразование координат, то получаем химический сдвиг ларморовской частоты определенного спина ядра:

$$\omega_{CS} = \gamma B_o \sigma_{zz}^{lab} = -\omega_0 \sigma_{zz}^{lab}, \quad (20)$$

где ω_0 – ларморовская частота ядра в магнитном поля \vec{B}_o . Элемент zz тензора экранирования записывается в PAS с использованием следующего преобразования:

$$\sigma_{zz}^{lab} = \vec{b}_0^{PAS} \sigma_{zz}^{PAS} \vec{b}_0^{PAS}. \quad (21)$$

Вектор \vec{b}_0^{PAS} выразим через полярные координаты (θ, ϕ) и собственные значения экранирующего тензора $\sigma_{xx}^{PAS}, \sigma_{yy}^{PAS}, \sigma_{zz}^{PAS}$. В таком случае уравнение (21), примет вид:

$$\omega_{CS} = \omega_0 (\sigma_{xx}^{PAS} (\cos \phi \sin \theta)^2 + \sigma_{yy}^{PAS} (\sin \phi \sin \theta)^2 + \sigma_{zz}^{PAS} (\cos \theta)^2). \quad (22)$$

Химический сдвиг ларморовской частоты можно представить ω_{CS} в виде суммы двух вкладов: изотропной части и анизотропной части (зависимой от ориентации) [17]:

$$\omega(\theta, \phi)_{CS} = -\sigma_{iso} \omega_0 + \frac{\delta}{2} (3 \cos^2 \theta - 1 - \eta \sin^2 \theta \cos(2\phi)), \quad (23)$$

В этой формуле $\delta = -\omega_0 \sigma_z$, σ_{iso} – изотропное значение химического сдвига, η – параметр асимметрии тензора АХС:

$$\sigma_{iso} = 1/3 \cdot (\sigma_{xx}^{PAS} + \sigma_{yy}^{PAS} + \sigma_{zz}^{PAS}), \quad (24)$$

$$\eta = (\sigma_{xx}^{PAS} - \sigma_{yy}^{PAS}) / \sigma_{zz}^{PAS}.$$

Кроме того спектр АХС принято характеризовать такими параметрами как:

$$\begin{aligned} \Delta &= \sigma_{zz}^{PAS} - \sigma_{iso}, \\ \Omega &= (\sigma_{zz}^{PAS} - \sigma_{xx}^{PAS}) \end{aligned} \quad (25)$$

где Δ – параметр анизотропии и Ω – полная анизотропия тензора АХС («tensor span»).

³¹P ЯМР фосфолипидов

Все фосфолипиды имеют в своем составе ядра фосфора. Ядро фосфора ³¹P характеризуется высоким гироманитным отношением ($1,083 \cdot 10^{-8} \text{ рад/Тл} \cdot \text{с}$) и его природное содержание равно 100%. Благодаря этому именно ядра фосфора ³¹P являются наиболее предпочтительными для анализа молекул фосфолипидов и структурной характеристики липосом.

Фосфолипиды в ламеллярной жидкокристаллической фазе L_α подвергаются быстрой аксиально-симметричной переориентации вокруг своей длинной оси – это приводит к частичному усреднению тензора экранирования. Усредненный тензор экранирования аксиально-симметричен относительно оси Z, что дает $\sigma_{xx} = \sigma_{yy} = \sigma_{\perp}$ и $\sigma_{zz} = \sigma_{\parallel}$. Типичную ширину тензора экранирования $\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \approx (45 - 50)$ мд обуславливают дополнительные усреднения движения в бислоях, которые вызваны раскачивающими движениями головной группы фосфолипидов [17]. Для мультисамеллярных липосом фосфолипида в ламеллярной жидкокристаллической фазе L_α форма линии ЯМР ³¹P показана на рисунке 16б.

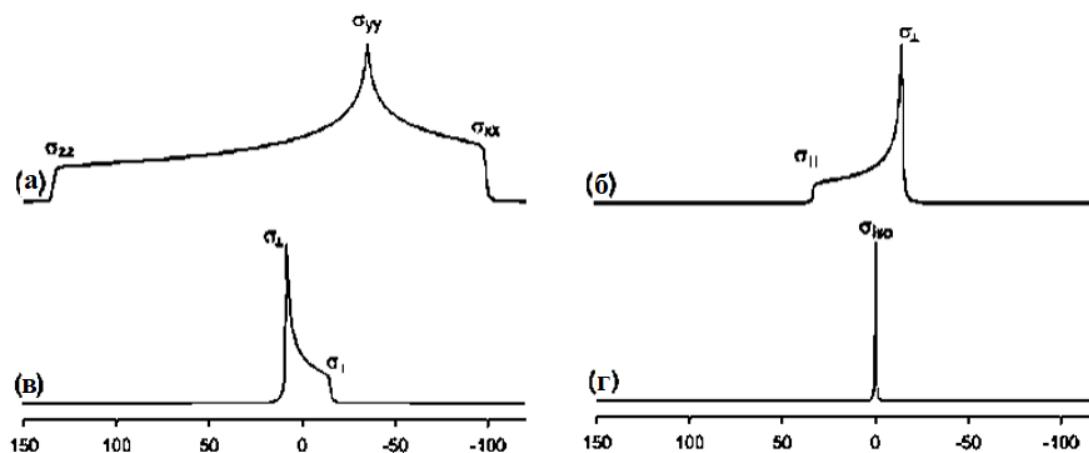


Рисунок 16 – Примеры возможных форм линий ЯМР ^{31}P для липидных систем [17]

В зависимости от температуры могут образовываться инвертированные фазы H_{II} . В этой фазе головные группы молекул фосфолипидов обращены внутрь цилиндра, где находится вода. Линия ЯМР ^{31}P гексагональной фазы H_{II} инвертированная и имеет половину ширины по сравнению с формой линии L_{α} (рисунок 16в). Быстрые изотропные движения молекулы вокруг одной оси наблюдаются для молекул фосфолипида в мицеллах растворителя. Они полностью усредняют анизотропную часть тензора экранирования, приводя к изотропному сигналу ЯМР ^{31}P (рисунок 16г).

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Основные принципы измерения T_2

Метод Карра-Парселла-Мейбума-Гилла (КПМГ) – это метод, который позволяет измерять время спин-спиновой (поперечной) релаксации. Метод КПМГ устраняет шумы, возникающие из-за неоднородности постоянного магнитного поля \vec{H}_0 с проявлением диффузионного вклада в затухание поперечной намагниченности.

В общем виде последовательность выглядит так: $90_x^0 - \tau - (180_y^0 - 2\tau(\text{эхо}))_n$, n – количество эхо, где τ – время между первыми 90^0 и 180^0 р.ч. импульсами [13, 14]. Где произведение $2n\tau$ – это время эволюции системы ядерных спинов.

В промежутке между 180^0 -ыми импульсами образуются сигналы спинового эха. На рисунке 17 показана последовательность радиоимпульсов КПМГ.

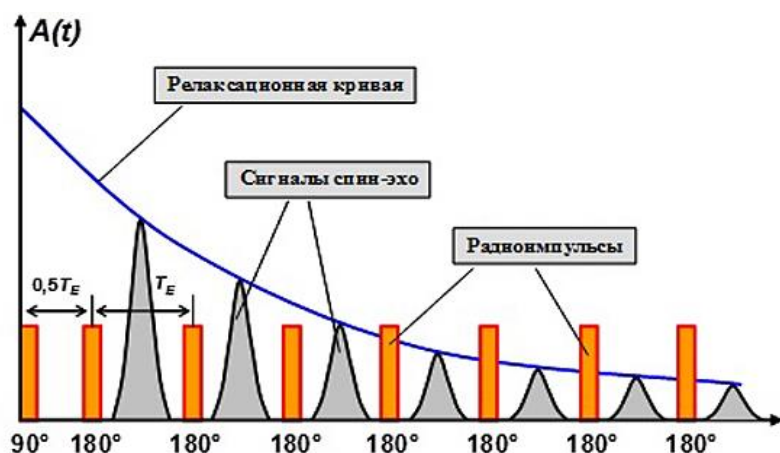


Рисунок 17 – Последовательность радиоимпульсов КПМГ

Вид релаксационной кривой, обусловлен лишь процессами поперечной релаксации. Выражение для этой кривой [13]:

$$A(t) = A_0 \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right). \quad (26)$$

Система из ядер с сильно отличающимися временами релаксации T_{2i} , имеет спад поперечной намагниченности вида:

$$A(t) = A_0 \sum_i p_i \exp\left(-\frac{t}{T_{2i}}\right), \quad (27)$$

где p_i – это относительная доля i -ой компоненты, причем $\sum_i p_i = 1$, T_{2i} – время спин-спиновой релаксации i -ой компоненты [13].

2.2 Измерения коэффициентов самодиффузии методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля

Величину коэффициента самодиффузии (КСД) можно получить из зависимости сигнала спинового эхо от величины постоянного (или импульсного) градиента магнитного поля. В этом методе используются двухимпульсная последовательность Хана (рисунок 18а) и трехимпульсная последовательность – стимулированное эхо (рисунок 18б) [15].

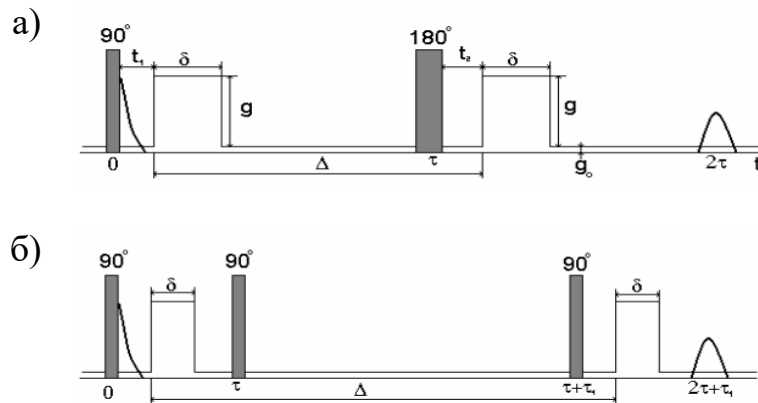


Рисунок 18 – Двухимпульсная последовательность Хана (а), (б) – трехимпульсная последовательность – стимулированное эхо с импульсным градиентом магнитного поля.

В последовательности Хана функция, которая описывает затухание амплитуды спинового эхо:

$$A(g, \tau) = A(0) \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \exp[-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_s], \quad (28)$$

где $A(0)$ – амплитуда эхо после первого импульса, τ – интервал между 90° и 180°-ыми импульсами, δ – длительность импульса градиента магнитного поля, D_s – коэффициент самодиффузии, t_d – время диффузии, g – градиент магнитного поля, T_2 – время спин-спиновой релаксации [15].

Затухание амплитуды для стимулированного эхо:

$$A(g^2, 2\tau, \tau_1) = \frac{A(0)}{2} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{\tau_1}{T_1}\right) \exp[-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_s], \quad (29)$$

где τ – интервал между первым и вторым 90° -ыми импульсами, τ_1 – интервал между вторым и третьим 90° -ыми импульсами, T_l – время спин-решеточной релаксации [15].

В простейшем случае для характеристики затухания амплитуды стимулированного эхо в многофазных системах с различными КСД D_{si} и временами релаксации T_{1i} и T_{2i} , используется выражение:

$$A(g^2, 2\tau, \tau_1) = \frac{A(0)}{2} \sum_i p'_i \exp[-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_{si}], \quad (30)$$

$$p'_i = \frac{p_i \left(-\frac{2\tau}{T_{2i}} - \frac{\tau_1}{T_{1i}} \right)}{\sum_i p_i \exp \left(-\frac{2\tau}{T_{2i}} - \frac{\tau_1}{T_{1i}} \right)}, \quad (31)$$

где p_i – это относительная доля i -ой компоненты, характеризующаяся КСД D_{si} и временами релаксации T_{1i} и T_{2i} ; $\sum_i p'_i = 1$ [15].

2.3. Оптическая микроскопия и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Микроскопия позволяет получить изображения тонкой структуры объектов с помощью микроскопа. Обычный световой микроскоп состоит из следующих обязательных оптических элементов: объектива, конденсора, окуляра, источника света и коллектора [18].

Объектив собирает лучи света от объекта исследования и создает первичное перевернутое изображение; система линз конденсора получает расходящиеся пучки света от источника; система линз окуляра переводит действительное первичное изображение в мнимое вторичное и дает увеличение; источник света – ртутные лампы или ксеноновые лампы (для флуоресцентной микроскопии), лазеры различных длин волн (для лазерной микроскопии); коллекторная линза настраивает освещение образца. На рисунке 19 показаны основные элементы простейшего светового микроскопа.



Рисунок 19 – Основные элементы простейшего светового микроскопа

Темнопольная микроскопия позволяет визуализировать только контуры объекта. Она обеспечивает практически неограниченный контраст, с ее помощью можно наблюдать мельчайшие объекты.

В конфокальной микроскопии осуществляется конфокальная фильтрация света – наблюдатель получает изображение лишь части препарата, находящейся в фокальной плоскости объектива. Для осуществления принципа конфокальности источник света должен быть точечным (лазер). Использование конфокального микроскопа значительно улучшает качество изображения и дает возможность получать «оптические срезы» биологического объекта, не нарушая его целостность [18]. На рисунке 20 приведена принципиальная схема работы конфокального микроскопа.

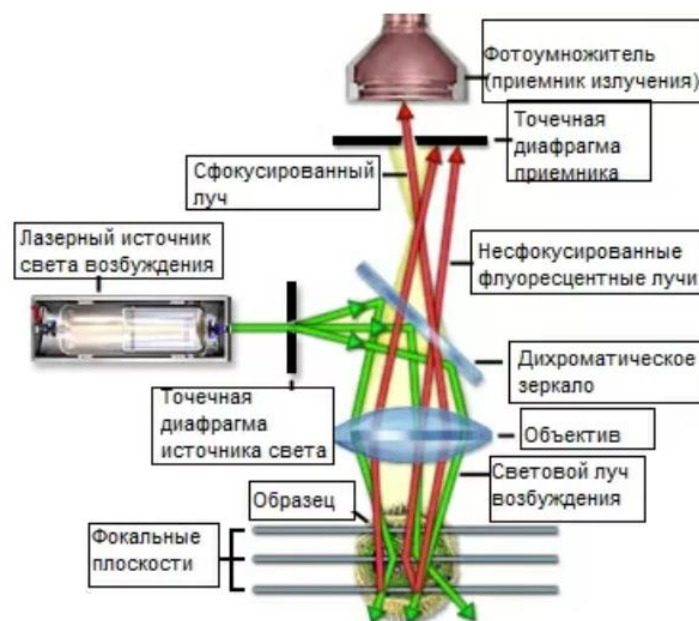


Рисунок 20 – Принципиальная схема работы конфокального микроскопа

2.4 Характеристики используемой аппаратуры и условия измерений

Измерения и регистрация ЯМР спектров на ядрах ^{31}P проводились на частоте резонанса 161,03 МГц и ядрах ^1H на частоте 400,26 МГц, при варьировании температуры от 293 до 328 К с шагом 5-10 К.

Исследования времен поперечной релаксации на ядрах ^1H проводились в спектрально-разрешенном режиме. Для измерения релаксационных затуханий и определения времен T_2 применялась последовательность КППМГ, изображенная на рисунке 17. Интервал между радиочастотными импульсами был равен 2мс. Значения температуры варьировались от 293 до 328 К с шагом 5-10 К..

Для измерения диффузионных затуханий (ДЗ) и определения КСД использовалась импульсная последовательность стимулированного эха, описанная ранее в пункте 2.2. В экспериментах Δ варьировалось в пределах от 50 мс до 1000 мс. Длительность δ импульса была постоянной 2,25 мс. Все измерения проводились при температуре 318 К. Градиент магнитного поля варьировался от 5 до 24 Тл/м. Результаты ЯМР экспериментов обрабатывались с помощью программ TopSpin (<https://www.bruker.com/protected/en/services/software-downloads /nmr .htm>) и dmfit (<https://nmr.cemhti.cnrs-orleans.fr/dmfit>).

2.5. Объекты исследования

Объектами исследования в нашей работе являлись мультиламеллярные липосомы (везикулы), состоящие из фосфолипида – соевого лецитина (фосфотидилхолина), плуроника F-127 и куркумина при концентрации куркумина 5%, 10%, 15% моль

Соевый лецитин – липоид S100

В работе использовался соевый лецитин марки Липоид S100 содержит в составе > 94 % фосфатидилхолина (рисунок 20). Приобретен в AVANTI Polar Lipids. Данный фосфолипид имеет молекулярную массу 758,1 г/моль.

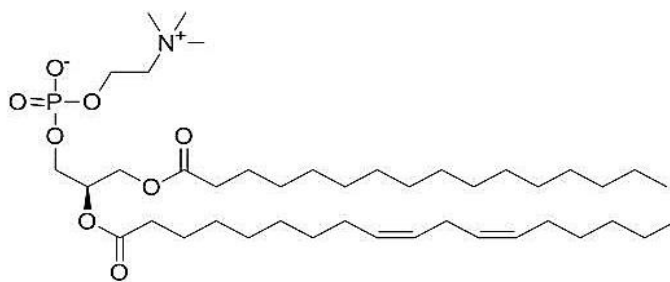


Рисунок 21 – Химическая структура липоида S100

Плюроник F-127

Полоксамеры (плороники) – водорастворимые неионогенные блок-сополимеры, состоящие из звеньев полиоксиэтилена (ПЭО) и пропиленоксида (ППО). В нашем случае в качестве плюроника был выбран плюроник F-127 (рисунок 21), так как данный вид плюроника обладает низкой токсичностью, амфифильностью и хорошей совместимостью с лекарственными препаратами. Так же в работе [1] исследовали липосомы, модифицированные различными плюрониками (F-127, F-87 и P-85) и обнаружили, что плюроник F-127 значительно улучшает биодоступность куркумина – инкапсулирующего вещества.

Молекулярная масса равна 12600 г/моль. Приобретен в Sigma (St. Louis, MO). Плюроник F-127 содержит 65 звеньев пропиленоксида, образующих гидрофобный блок, и гидрофильный блок этиленоксида, масса которого составляет 70 % от массы всей макромолекулы

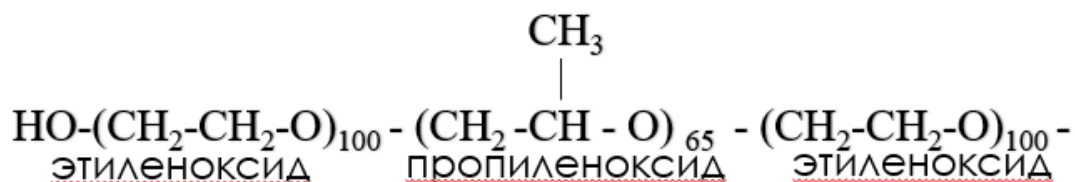


Рисунок 22 – Структурная формула плюроника F127

Куркумин

Структурная формула куркумина изображена на рисунке 22. Молекулярная масса куркумина равна 368,38 г/моль. Приобретен в Sigma (St.

Louis, MO). Куркумин – гидрофобное полифенольное соединение природного происхождения.

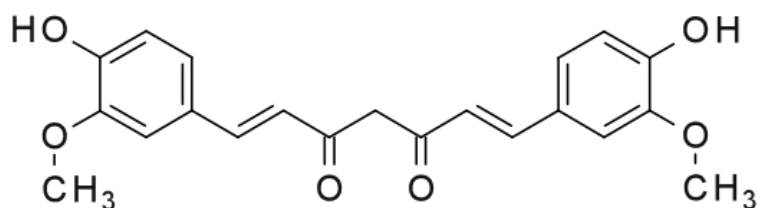


Рисунок 23 – Структура куркумина

2.5 Методика приготовления образцов

Для приготовления образцов использовали метод гидратации тонкой пленки. Первым этапом приготовления образцов было растворение смеси лецитина, плуроника и куркумина в этаноле. Затем выпаривали растворитель потоком инертного газа, а далее высушивали под вакуумом (лиофилизация) в течение 24 часов, благодаря чему образовалась тонкая пленка. Следующим этапом было растворение пленки необходимым количеством дейтерированной воды, все тщательно перемешивалось и подвергалось 3-4 циклам заморозки при $T=70^{\circ}\text{C}$ и оттаивания при $T\approx 40^{\circ}\text{C}$ как описано в работе [19]. Дополнительно образцы подвергались воздействию ультразвука в течение 20 минут. Таким образом мы получили образцы для проведения ЯМР эксперимента. Все этапы схематично представлены на рисунке 24.

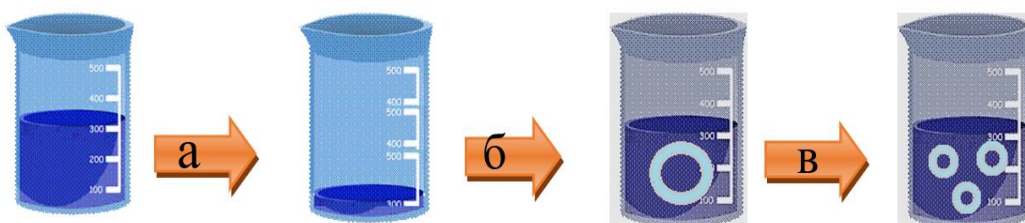


Рисунок 24 – Схематичное представление методики приготовления образцов: (а) – выпаривание растворителя (потоком воздуха и лиофилизация) и получение тонких пленок; (б) – гидратирование; (в) – циклы заморозки/таяния (получение мультиламеллярных липосом)

В результате для исследования, были приготовлены следующие образцы:

- суспензия липосом из фосфатидилхолина (ФХ) и плуроника F-127 с концентрацией плуроника 1,2 моль% (содержание липида и плуроника в дейтерированной воде составило 50 вес.%);
- суспензии липосом из ФХ, плуроника F-127 (1,2 моль%) с концентрацией куркумина 5, 10, 15 моль% (содержание липида, плуроника в дейтерированной воде составило 50 вес.%).

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Исследование фазового поведения систем на основе липида, плуроника и куркумина по данным ^{31}P ЯМР спектроскопии

При исследовании структурной организации и фазового поведения липидных систем применяется метод ^{31}P ЯМР спектроскопии. Этот метод хорошо чувствует изменения в молекулярной ориентации полярных головок фосфолипидов при добавлении различных молекул в липидный бислой.

Для систем, которые исследуются в данной работе форма линии ^{31}P ЯМР спектра определяется аксиально-симметричным тензором экранирования. Он вызван быстрым вращением вокруг собственной оси молекул липидов. На рисунке 25а представлен типичный ^{31}P ЯМР спектр суспензии из лецитина и плуроника F-127 при температуре 318К.

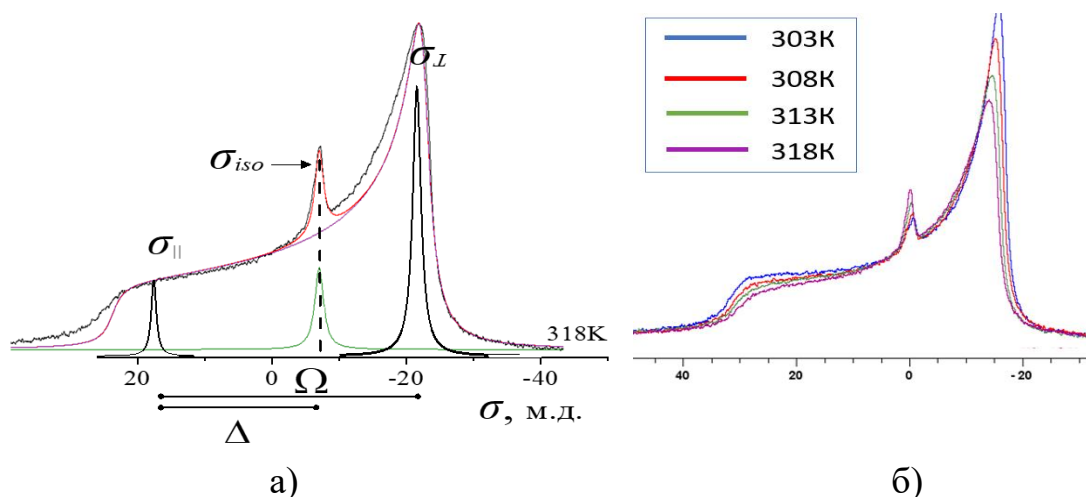


Рисунок 25 а) – ^{31}P ЯМР спектр суспензии из лецитина и плуроника F-127 при температуре 318К; б) – ^{31}P ЯМР спектры суспензии из лецитина и плуроника F-127 при нагревании $T=303\text{--}318\text{K}$

Данный спектр характеризуется наличием высокого пика в области -10 – -15 м.д. (σ_{\perp} – компонента, ориентированная перпендикулярно магнитному полю), широкого «плеча» в области $30\text{--}20$ м.д. (σ_{\parallel} – компонента, ориентированная параллельно магнитному полю) и изотропным пиком (σ_{iso}).

Наблюдаемая форма линии спектра аксиально-симметрична – это говорит о том, что суспензия из липосом из ФХ и плуроника F-127 1,2 моль% находится в ламеллярной жидкокристаллической фазе (области

формирования везикул) L_a . Так же на данном спектре наблюдается характерный изотропный сигнал из этого следует, что в исследуемой системе липид–плюроник присутствует изотропная фаза. В работе [11] предполагается, что существование этой фазы обусловлено быстрым изотропным вращением мицелл. Мицеллы в исследуемом образце могут образоваться либо при преобразовании плюроником липосом в мицеллы, либо при захвате фосфолипидов плюроником [1].

При нагревании системы с 303К по 318К с шагом 5-10К (рисунок 25б) мы наблюдали сохранение формы линии спектра, что говорит о нахождении суспензии из липосом из ФХ и плюроника F-127 в ламеллярной жидкокристаллической фазе во всем исследуемом диапазоне температур. С ростом температуры увеличивается доля изотропной составляющей с 1,5% до 3% — это обусловлено увеличением количества мицелл, совершающих изотропное вращение, в исследуемой системе.

В таблице 1 приведены следующие параметры: изотропное значение химического сдвига σ_{iso} , значения параметра анизотропии Δ_{CSA}^0 и параметра полной анизотропии химического сдвига Ω для суспензии липосом из фосфатидилхолина (ФХ) и плюроника F-127 с концентрацией плюроника 1,2 моль% и суспензий липосом из ФХ, плюроника F-127 с различной концентрацией куркумина 5, 10 и 15 моль%, при различных температурах $T=303-318K$.

Таблица 1 – Спектральные параметры

Т, К	Изотропное значение химического сдвига σ_{iso}	Параметр анизотропии Δ				Полная анизотропия химического сдвига Ω			
	303-318К	303К	308К	313К	318К	303К	308К	313К	318К
суспензия липосом из ФХ и плуроника F-127 с концентрацией плуроника 1,2 моль%	0,62	26,2	25,6	25,3	25,2	40,7	39,6	39,0	38,6
суспензии ФХ, плуроника F-127 с концентрацией куркумина 5 моль%	0,62	26,7	26,7	26,2	26,2	41,2	40,9	40,3	39,9
суспензии ФХ, плуроника F-127 с концентрацией куркумина 10 моль%	0,62	26,5	26,4	26,2	26,2	41,3	40,7	40,2	39,5
суспензии ФХ, плуроника F-127 с концентрацией куркумина 15 моль%	0,62	27,2	26,2	25,4	25,4	42,4	40,7	39,6	38,9

На рисунке 26 представлены спектры суспензии из липосом из ФХ, плуроника F-127 и куркумина с различной концентрацией куркумина 5, 10 и 15 моль% при различных температурах $T=303-318\text{K}$. Как видно при добавлении куркумина в систему форма линий спектра сохраняется, что говорит о наличии ламеллярной жидкокристаллической и изотропной фазы и в суспензиях с концентрацией куркумина 5 моль%, 10 моль% и 15 моль%.

При нагревании и охлаждении суспензии с концентрацией куркумина 5 моль% (рисунок 26а) изотропное значение химического сдвига σ_{iso} остается постоянным, а доля изотропного сигнала увеличивается с 0,9% до 1,5%.

Для суспензии лецитина, плуроника и куркумина 10 моль% (рисунок 26б) доля изотропной составляющей была одинакова при варьировании температуры и равнялась 1,5%. Суспензия с более высокой концентрацией куркумина (рисунок 26в) также показывает сохранение изотропного значения химического сдвига σ_{iso} постоянным, а доля изотропного сигнала увеличивается с 0,9% до 1,5%.

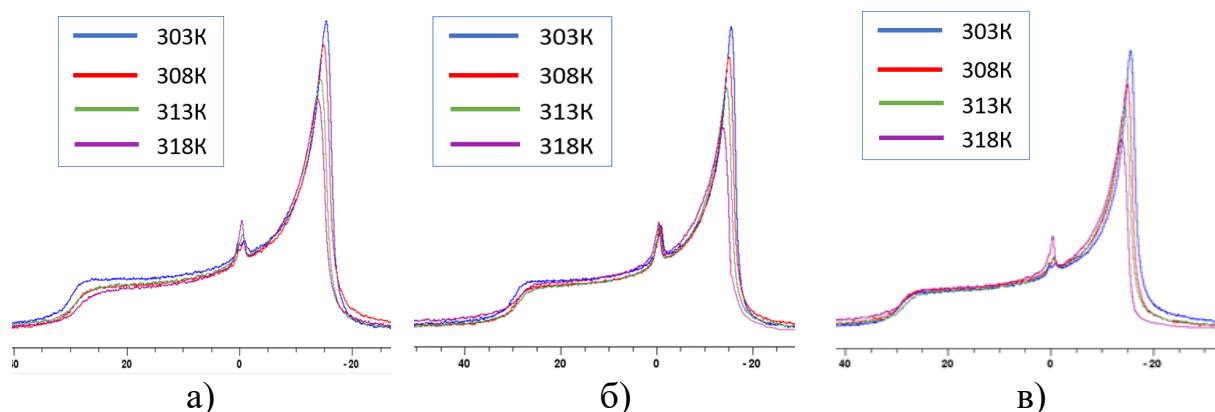


Рисунок 26 а) – ^{31}P ЯМР спектры суспензии из лецитина, плуроника F-127 и куркумина с концентрацией куркумина 5 моль%; б) – ^{31}P ЯМР спектры суспензии из лецитина, плуроника F-127 и куркумина с концентрацией куркумина 10 моль%; в) – ^{31}P ЯМР спектры суспензии из лецитина, плуроника F-127 и куркумина с концентрацией куркумина 15 моль% при различных температурах $T=303\text{-}318\text{K}$

Таким образом, анализ спектров ^{31}P ЯМР показал наличие в исследуемых системах двух фаз: ламеллярной жидкокристаллической фазы (область формирования липосом) и изотропной фазы, обусловленной движением мицелл, содержащих молекулы фосфолипидов.

3.2 ЯМР спектроскопия ^1H в исследовании систем на основе плуроника, липидов и куркумина

На рисунке 27 приведены ЯМР ^1H спектры для суспензии липосом из ФХ и плуроника, суспензий липосом из ФХ, плуроника и куркумина с концентрацией куркумина 5 моль%, 10 моль% и 15 моль%. Для идентификации наблюдаемых в спектре сигналов от протонов фосфатидилхолина и плуроника, полученные спектры сопоставили со спектрами для водного раствора плуроника и для суспензии фосфатидилхолина.

На ЯМР ^1H спектрах для суспензии фосфатидилхолина сигналы в области 2,5-0,8 м.д. относятся к протонам групп $\text{H}_2\text{C}-\text{C}=\text{C}$, $(\text{CH}_2)_n$ и концевым CH_3 группам углеводородной цепи ФХ, а спектральные линии в

области химических сдвигов 4,2-3 м.д. соответствуют группам POCH_2 , CH_2N и $\text{N}(\text{CH}_3)_3$, принадлежащие к полярным «головкам» липидов.

Форма линий спектра суспензии ФХ и плюроника похожа на спектр водного раствора плюроника. Наблюдается интенсивный резонансный сигнал при 3,8 м.д., относящийся к протонам $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ группы полиэтиленоксидного блока плюроника. Однако сигналы в интервале 3,3-3,6 м.д., которые связаны с группами $\text{CH}_2-\text{CH}-$ и $\text{CH}-\text{O}$ полипропиленоксидного (ППО) блока плюроника и которые присутствуют на спектре плюроника на спектре суспензии ФХ и плюроника явно не проявляются. Сигнал от протонов концевых CH_3 групп углеводородных цепей ФХ и сигнал от протонов CH_3 групп ППО блока плюроника объединились в суммарный уширенный сигнал, наблюдаемый в области 1,5-0,7 м.д. в общем наличие фосфатидилхолина в системе приводит к уширению и снижению разрешения контура спектральных линий ЯМР ^1H спектра.

Форма линии ЯМР ^1H спектра суспензии ФХ, плюроника и 5 моль% куркумина и суспензии ФХ, плюроника и 10 моль% куркумина схожа с формой линий спектра суспензии ФХ и плюроника. Однако для суспензии ФХ, плюроника и 15 моль% куркумина форма линий сильно отличается. Наблюдается значительное уширение спектральных линий, что возможно связано с образованием агрегатов [20].

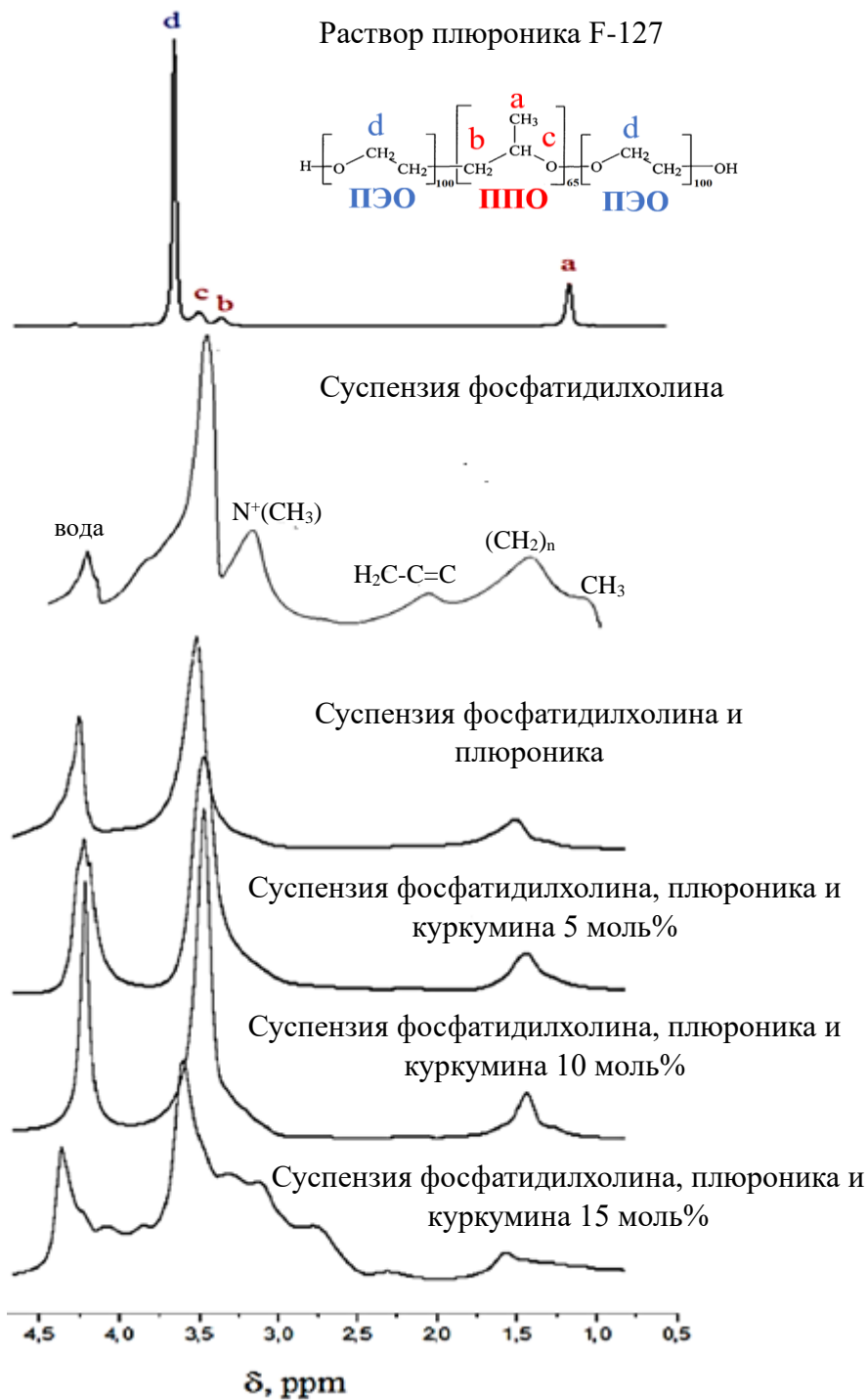


Рисунок 27 – ЯМР ^1H спектры для раствора плуроника F-127, суспензии фосфатидилхолина, суспензии фосфатидилхолина и плуроника, суспензии фосфатидилхолина, плуроника и куркумина с различной концентрацией куркумина при $T=303\text{K}$

3.3 Исследование поперечной ЯМР релаксации на ядрах ^1H в системах на основе липидов, плюроника и куркумина

Анализ данных ЯМР релаксометрии осуществлялся по двум спектральным областям в диапазонах химических сдвигов от 4,0 до 2,25 м.д. (область 1) и от 1,75 до 0,75 м.д. (область 2). В спектральной области 1 основной вклад вносят протоны холиновой группы фосфатидилхолина, а также присутствует вклад от протонов ПЭО блоков плюроника. В спектральной области 2 основной вклад вносят протоны углеводородных цепей фосфатидилхолина и протоны ППО. Таким образом, проанализировав выбранные две области, мы сможем получить информацию о молекулярной подвижности холиновой группы и углеводородных цепей фосфатидилхолина в присутствии плюроника и куркумина.

Параметры ЯМР-релаксации позволяют анализировать подвижность отдельных частей макромолекул или, иными словами, дает информацию о динамических процессах в системе с мультислойными липидными везикулами. Измерения спадов сигнала поперечной намагниченности (СПН) ЯМР ^1H проводились при температуре $T=308\text{K}$ с помощью импульсной методики КПМГ.

Ниже на рисунке 28 представлены типичные спады поперечной намагниченности (СПН) для суспензии фосфатидилхолина с концентрацией 50 вес.% по спектральным областям 1 и 2.

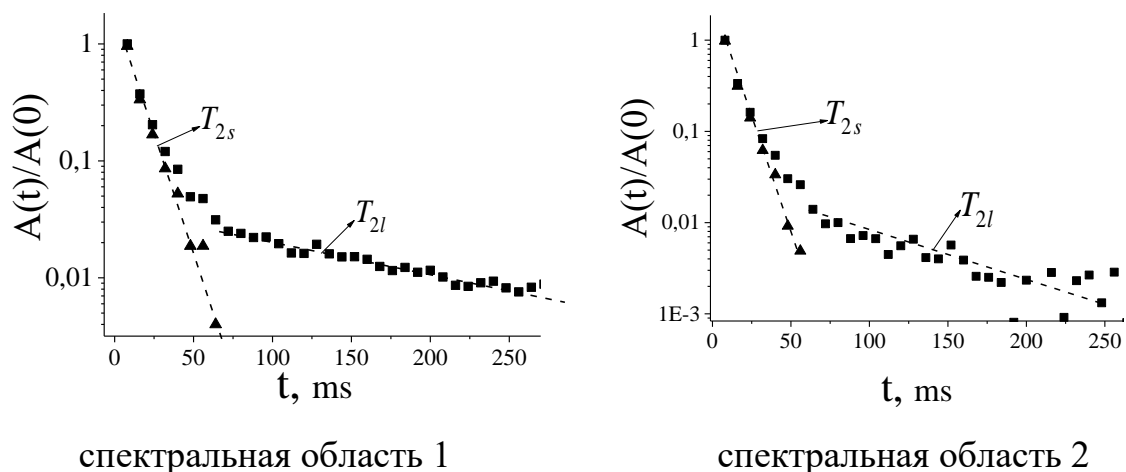


Рисунок 28 – Спад поперечной намагниченности для суспензии фосфатидилхолина с концентрацией 50 вес.% при температуре $T=308\text{K}$

Спады поперечной намагниченности каждой спектральной области содержат две компоненты с характерными временами релаксации T_{2l} (хвост релаксационного затухания) и T_{2s} (короткая компонента). Затухания амплитуд спиновых эхо можно представить в виде:

$$A(t) = p_l \exp\left(-\frac{t}{T_{2l}}\right) + p_s \exp\left(-\frac{t}{T_{2s}}\right), \quad (31)$$

где $A(t)$ – функция, описывающая релаксационное затухание, $A(0)$ – начальная амплитуда, T_{2l} – время релаксации «длинной» компоненты с населенностью p_l , и T_{2s} – время релаксации «короткой» компоненты с населенностью p_s .

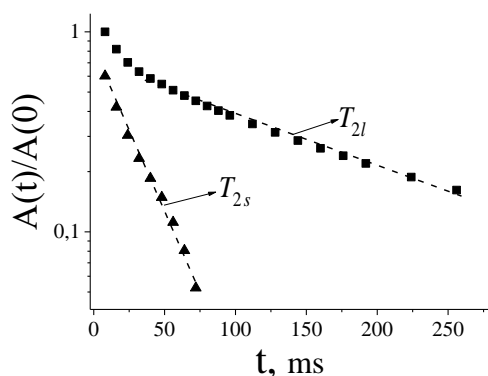
Значения времен спин-спиновой релаксации для суспензии ФХ при температуре $T=308\text{K}$ по спектральным областям 1 и 2 представлены в таблице 2:

Таблица 2 – Времена спин-спиновой релаксации для суспензии ФХ 50 вес.% при $T=308\text{K}$

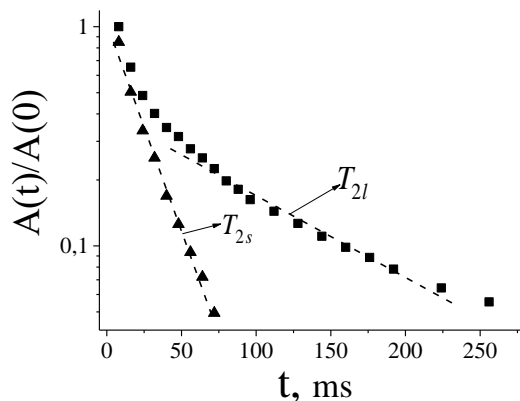
	Спектральная область	T_{2l} , мс (p_l)	T_{2s} , мс (p_s)
Суспензия из ФХ 50 вес.%	1	159 (0,03)	17 (0,97)
	2	81 (0,02)	17 (0,98)

Короткие времена релаксации характеризуют «медленные» движения, в то время как длинные времена относятся к сравнительно быстрым движениям в системе. Исходя из данных таблицы можно предположить, что для суспензии ФХ 50 вес.% время релаксации T_{2l} относится к подвижным структурам, таким как мицеллы, а время T_{2s} – движение мультиламеллярных везикул как целое. Поскольку доля подвижных мицелл мала в данной системе, в спектре ^{31}P не наблюдается наличия изотропного пика.

На рисунке 29 показаны типичные спады поперечной намагниченности (СПН) для суспензии фосфатидилхолина и плюроники F-127 с концентрацией плюроники 1,2 моль% по спектральным областям 1 и 2.



спектральная область 1



спектральная область 2

Рисунок 29 – СПН для суспензии ФХ и плуроника с концентрацией 1,2 моль% при температуре T=308K

СПН суспензии ФХ и плуроника для каждой спектральной области так же содержат две компоненты с характерными временами релаксации T_{2l} (хвост релаксационного затухания) и T_{2s} (короткая компонента). Затухания амплитуд спиновых эхо можно представить в виде:

$$A(t) = p_l \exp\left(-\frac{t}{T_{2l}}\right) + p_s \exp\left(-\frac{t}{T_{2s}}\right), \quad (32)$$

Полученные значения времен спин-спиновой релаксации для суспензии ФХ при температуре T=308K по спектральным областям 1 и 2 представлены в таблице 3:

Таблица 3 – Времена спин-спиновой релаксации для суспензии ФХ и плуроника 1,2 моль% при T=308K

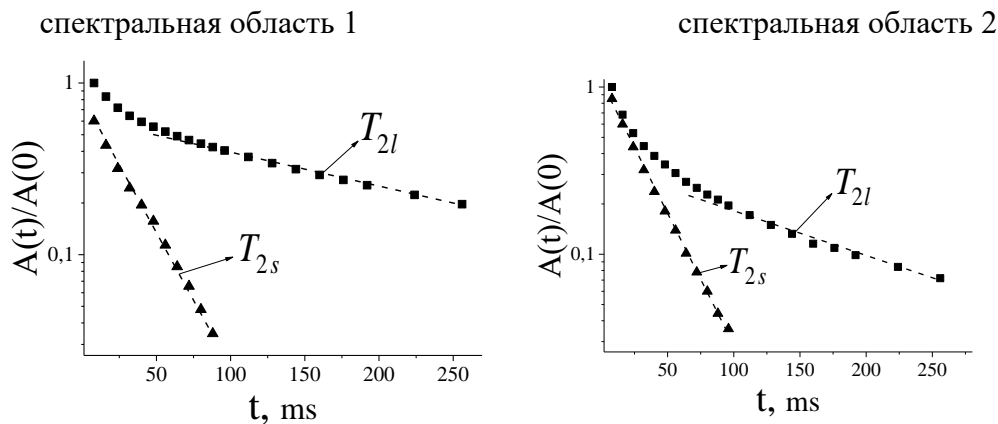
	Спектральная область	T_{2l} , мс (p_l)	T_{2s} , мс (p_s)
Суспензия из ФХ и плуроника F-127 2 моль%	1	290,0 (0,4)	35,9 (0,6)
	2	270,2 (0,15)	29,8 (0,85)

Из данных таблицы видно, что для суспензии ФХ и плуроника 1,2 моль% доля населенности компоненты релаксационного затухания с длинными временами релаксации увеличилась, что может быть связано проявлением в спектре ^{31}P изотропного сигнала, характерного для «свободных» мицелл.

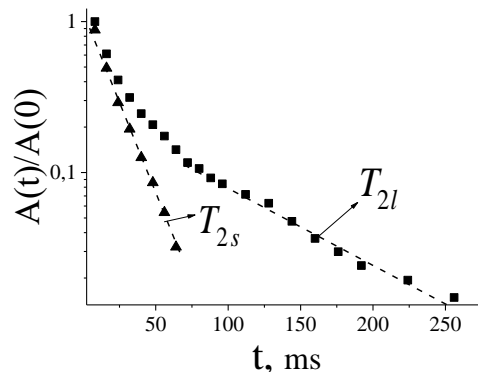
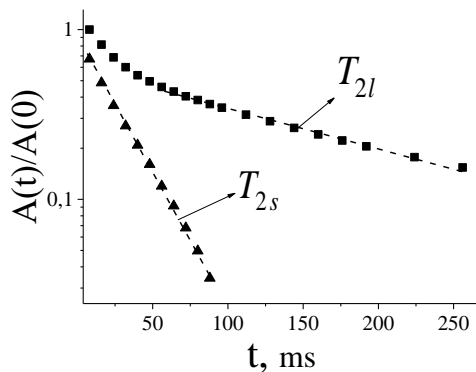
Полученные времена поперечной релаксации T_{2s} , T_{2l} , описывают молекулярную подвижность разных составляющих фосфатидилхолина и плуроника для разных спектральных областей. Для спектральной области 1: время T_{2l} длинной компоненты возможно относится к релаксации протонов ПЭО блоков плуроника в мицеллах, компонента со временем T_{2s} характеризует релаксацию холиновой группы фосфатидилхолина и малоподвижных ПЭО блоков. Для спектральной области 2: компонента со временем T_{2l} описывает релаксацию протонов углеводородных цепей фосфатидилхолина, а твердотельная компонента со временем T_{2s} характеризует релаксацию углеводородных цепей молекул фосфатидилхолина, образующих липидный бислой мультиламеллярных везикул.

Добавление плуроника в систему приводит к увеличению времен спин-спиновой релаксации для обеих компонент по всей спектральной области, что вероятно говорит об уменьшении размеров везикул. Это согласуется с данными работы [1], в которой наблюдалось уменьшение размеров липосом при включении в их липидный бислой плуроника.

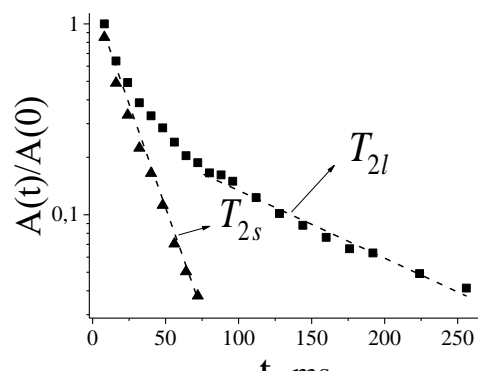
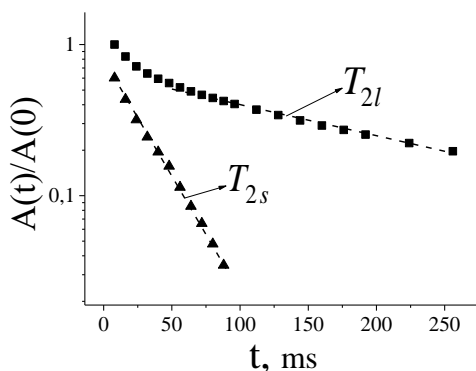
На рисунке представлены типичные спады поперечной намагниченности (СПН) для суспензий ФХ, плуроника и куркумина 5, 10 и 15 моль % по спектральной области 1 и 2 при температуре $T=308\text{K}$.



Суспензия ФХ, плуроника и 5 моль% куркумина



Суспензия ФХ, плуроника и 10 моль% куркумина



Суспензия ФХ, плуроника и 15 моль% куркумина

Рисунок 30 – Спад поперечной намагниченности для суспензии фосфатидилхолина, плуроника и куркумина с различными концентрациями куркумина 5, 10 и 15 моль% при температуре $T=308\text{K}$

Добавление куркумина в систему не вносит изменения в вид СПН. Затухания амплитуд спиновых эхо так же можно представить в виде:

$$A(t) = p_l \exp\left(-\frac{t}{T_{2l}}\right) + p_s \exp\left(-\frac{t}{T_{2s}}\right), \quad (32)$$

Полученные значения времен спин-спиновой релаксации для суспензии ФХ, плуроника и курумина различной концентрации представлены в таблице 4:

Таблица 4 – Времена спин-спиновой релаксации для суспензии ФХ, плюроники и куркумина различной концентрации 5, 10 и 15 моль% при T=308K

T(K)	Образец 2 (ФХ, плюроник и 5 моль% куркумин)	Образец 3 (ФХ, плюроник и 10 моль% куркумин)	Образец 4 (ФХ, плюроник и 15 моль% куркумин)	Образец 2 (ФХ, плюроник и 5 моль% куркумин)	Образец 3 (ФХ, плюроник и 10 моль% куркумин)	Образец 4 (ФХ, плюроник и 15 моль% куркумин)
	$T_{2l}, \text{мс} (P_l)$			$T_{2s}, \text{мс} (P_s)$		
308	338,9 (0,40)	342,9 (0,33)	284,2 (0,38)	37,2 (0,60)	36,9 (0,67)	35,3 (0,62)

Из данных таблицы видно, что для суспензий ФХ, плюроники и куркумина с концентрацией 5, 10, 15 моль% отношение долей населенностей компонент при изменении концентрации куркумина остается постоянным и равно отношению долей населенностей для суспензии ФХ и плюроники, что подтверждает сохранение изотропного пика в спектрах ^{31}P для суспензий ФХ, плюроники и куркумина с различной концентрацией.

3.4 Температурные зависимости времен поперечной релаксации

На рисунке 31 представлены спады поперечной намагниченности (СПН) для суспензии ФХ и плюроники и суспензий ФХ, плюроники и куркумина 5, 10 и 15 моль % по спектральной области 1 и 2. Измерения спадов сигнала поперечной намагниченности (СПН) ЯМР ^1H проводились при температурах 293-318K с шагом 5-10K с помощью импульсной методики КПМГ.

СПН для обеих спектральных областей суспензии ФХ и плюроники и суспензий фосфатидилхолина, плюроники и куркумина с различной концентрацией куркумина при изменении температуры имеют одинаковую двухкомпонентную сложную форму.

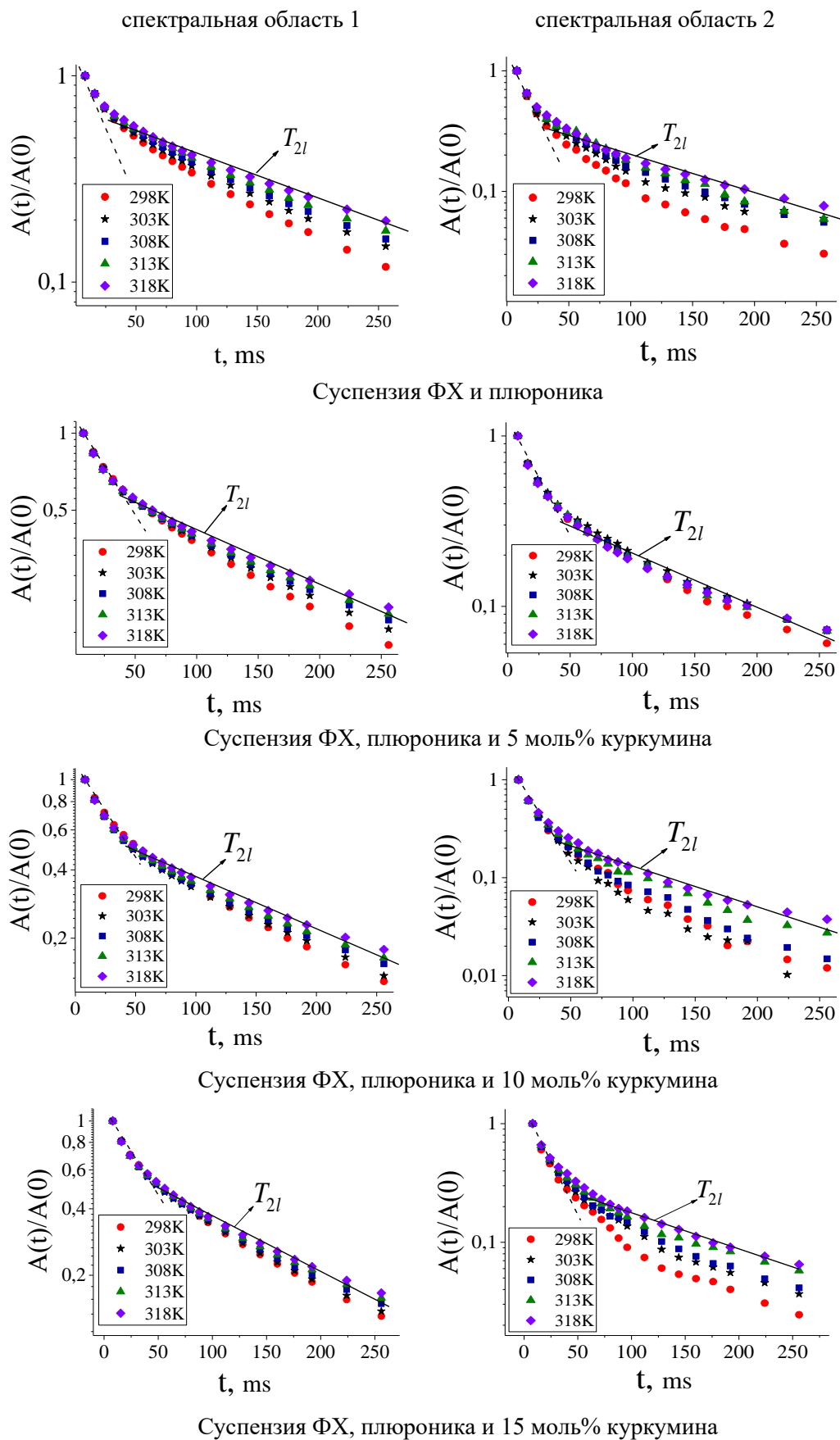


Рисунок 31 – Спады поперечной намагниченности (СПН) для суспензии ФХ и плуроника и суспензий ФХ, плуроника и куркумина 5, 10 и 15 моль % по спектральной области 1 и 2

Затухания амплитуд спиновых эхо так же имеет вид:

$$A(t)/A(0) = p_l \exp\left(-\frac{t}{T_{2l}}\right) + p_s \exp\left(-\frac{t}{T_{2s}}\right) \quad (32)$$

где p_l и T_{2l} – населенность и время релаксации длинной компоненты релаксационного затухания, p_s и T_{2s} – населенность и время релаксации короткой компоненты.

Характер спада поперечной намагниченности для суспензии ФХ и плуроника и для суспензий ФХ, плуроника и куркумина различной концентрации одинаков, что говорит о наличии мицелл, и мультиламеллярных везикул во всех исследуемых образцах.

Значения поперечной релаксации жидкостной компоненты T_{2l} , твердотельной T_{2s} и их населенности p_l, p_s при нагревании суспензии из ФХ и плуроника и суспензий из ФХ, плуроника и куркумина с различными концентрациями куркумина по спектральной области 1 представлены в таблице 5. Таблица 5 – Температурные зависимости времен поперечной релаксации для спектральной области 1

Т(К)	Образец 1 (ФХ, плуроник)	Образец 2 (ФХ, плуроник и 5 моль% куркумин)	Образец 3 (ФХ, плуроник и 10 моль% куркумин)	Образец 4 (ФХ, плуроник и 15 моль% куркумин)	Образец 1 (ФХ, плуроник)	Образец 2 (ФХ, плуроник и 5 моль% куркумин)	Образец 3 (ФХ, плуроник и 10 моль% куркумин)	Образец 4 (ФХ, плуроник и 15 моль% куркумин)
	T_{2l} , мс (p_l)				T_{2s} , мс (p_s)			
298	235,3 (0,38)	275,8 (0,38)	294,2 (0,32)	252,0 (0,38)	34,7 (0,62)	40,3 (0,62)	42,5 (0,68)	35,9 (0,62)
303	264,5 (0,38)	309,9 (0,40)	313,2 (0,32)	292,4 (0,35)	35,7 (0,62)	37,9 (0,60)	38,0 (0,68)	36,7 (0,65)
308	290,0 (0,40)	338,9 (0,40)	342,9 (0,33)	284,2 (0,38)	35,9 (0,60)	37,2 (0,60)	36,9 (0,67)	35,3 (0,62)
313	329,7 (0,38)	362,3 (0,40)	321,7 (0,38)	303,4 (0,38)	39,6 (0,62)	37,3 (0,60)	33,6 (0,62)	35,1 (0,62)
318	334,1 (0,42)	400,6 (0,40)	381,4 (0,35)	327,9 (0,38)	36,8 (0,58)	38,4 (0,60)	37,2 (0,65)	36,2 (0,62)

При нагревании суспензии из фосфатидилхолина и плуроника время поперечной релаксации T_{2l} увеличивается с 235 до 334 мс, что говорит о зависимости молекулярной подвижности холиновой группы молекул фосфатидилхолина, входящих в состав мицелл, от температуры. При добавлении куркумина времена T_{2l} увеличились на всем диапазоне температур, однако с увеличением концентрации куркумина заметно уменьшение времен T_{2l} , подобное может быть связано с уменьшением подвижности холиновой группы в составе мицелл. На рисунке 32 представлены данные таблицы 5.

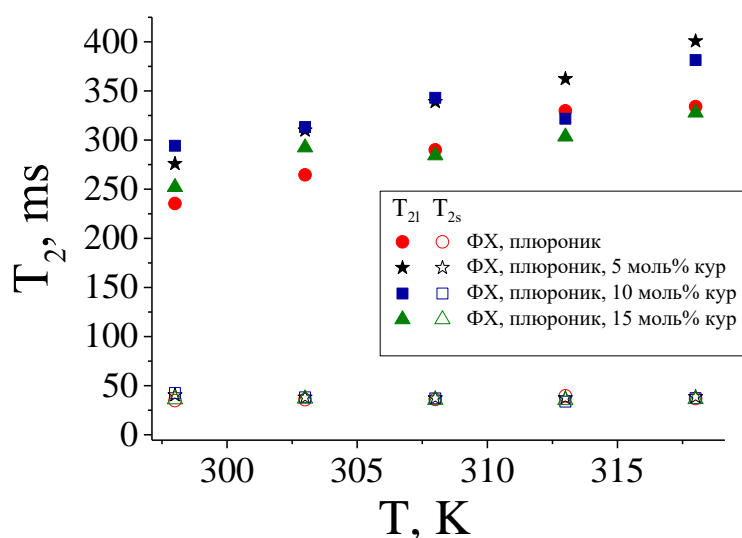


Рисунок 32 – Температурные зависимости времен поперечной релаксации твердотельной T_{2s} и жидкофазной T_{2l} компонент для суспензии из ФХ и плуроника и суспензий из ФХ, плуроника и куркумина с различными концентрациями куркумина 5, 10 и 15 моль% по спектральной области 1

Времена релаксации T_{2s} находятся в диапазоне 34-40 мс и практически неизменны при повышении температуры, при добавлении куркумина и изменении его концентрации. Подобное поведение присуще протонам молекул с ограниченной локальной подвижностью, как например, для молекул, включённых в мультиламеллярные везикулы. Населенность ρ_s так же неизменна, что вероятно свидетельствует о сохранении количества

образованных липосом модифицированных плуроником при варьировании концентрации куркумина и температуры.

Значения поперечной релаксации компоненты T_{2l} , твердотельной T_{2s} и их населенности p_l, p_s при нагревании суспензии из ФХ и плуроника и суспензий из ФХ, плуроника и куркумина с различными концентрациями куркумина по спектральной области 2 представлены в виде таблицы 6:

Таблица 6 – Температурные зависимости времен поперечной релаксации для спектральной области 2

Т(К)	Образец 1 (ФХ, плурон- ик)	Образец 2 (ФХ, плурон- ик, 5 моль% курку- мина)	Образец 3 (ФХ, плурон- ик, 10 моль% курку- мина)	Образец 4 (ФХ, плурон- ик, 15 моль% курку- мина)	Образец 1 (ФХ, плурон- ик)	Образец 2 (ФХ, плурон- ик, 5 моль% курку- мина)	Образец 3 (ФХ, плурон- ик, 10 моль% курку- мина)	Образец 4 (ФХ, плурон- ик, 15 моль% курку- мина)
	T_{2l} , мс (p_l)				T_{2s} , мс (p_s)			
298	172,0 (0,15)	278,8 (0,16)	121,3 (0,11)	215,8 (0,10)	25,5 (0,85)	32,2 (0,84)	24,7 (0,89)	27,6 (0,90)
303	225,1 (0,18)	275,0 (0,20)	130,0 (0,12)	204,4 (0,15)	25,2 (0,82)	31,1 (0,80)	21,5 (0,88)	27,2 (0,85)
308	270,2 (0,15)	285,8 (0,19)	140,0 (0,12)	234,3 (0,15)	29,8 (0,85)	30,4 (0,81)	24,8 (0,88)	27,5 (0,85)
313	301,9 (0,14)	342,3 (0,15)	189,0 (0,12)	269,6 (0,17)	31,5 (0,86)	33,3 (0,85)	26,0 (0,88)	28,1 (0,83)
318	297,7 (0,19)	315,6 (0,17)	219,2 (0,13)	199,9 (0,27)	28,5 (0,81)	38,4 (0,83)	27,6 (0,87)	24,8 (0,73)

При нагревании суспензии из фосфатидилхолина и плуроника время поперечной релаксации T_{2l} увеличивается с 172 до 297 мс, это возможно связано с увеличением молекулярной подвижности углеводородных цепей фосфатидилхолина и гидрофобных ППО блоков плуроника, входящих в состав мицелл. При добавлении 5 моль% куркумина времена T_{2l} увеличились с 172 до 278 мс и с 297 до 315 мс. По мере увеличения концентрации куркумина с 5 до 15 моль% времена T_{2l} уменьшаются с 315 до 199 мс, что свидетельствует об уменьшении подвижности концевых цепей

фосфатидилхолина и ППО блоков плюроника. Времена релаксации T_{2s} находятся в диапазоне 21-38 мс и практически неизменны при повышении температуры, при добавлении куркумина и изменении его концентрации. Таким образом, время релаксации T_{2s} описывает молекулярную подвижность углеводородных цепей молекул фосфатидилхолина, образующих липидный бислой везикулы. На рисунке 33 представлены данные таблицы 6.

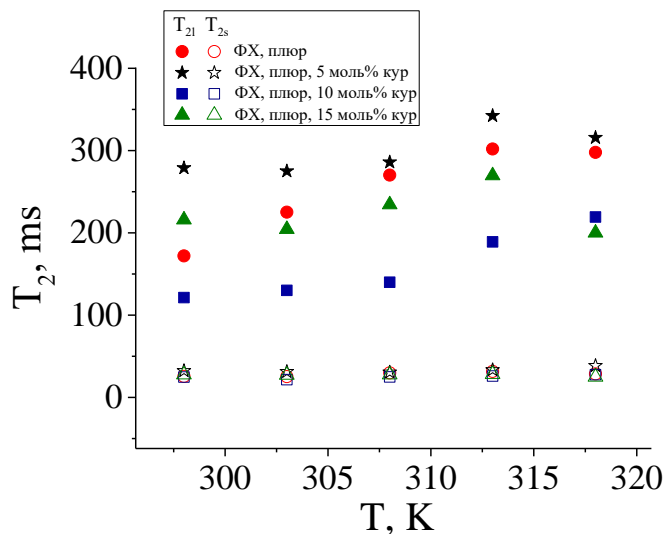


Рисунок 33 – Температурные зависимости времен поперечной релаксации твердотельной T_{2s} и жидкофазной T_{2l} компонент для суспензии из ФХ и плюроника и суспензий из ФХ, плюроника и куркумина с различными концентрациями куркумина 5, 10 и 15 моль% по спектральной области 2

Отсутствие зависимости поперечной релаксации T_{2s} от температуры свидетельствует, что во всем температурном диапазоне для систем с различной концентрацией куркумина присутствуют мультиламеллярные везикулы.

3.5 Форма диффузионных затуханий в липид-полимерных системах

Типичное диффузионное затухание (ДЗ) амплитуды сигнала стимулированного эхо для системы фосфатидилхолина и плюроника с

концентрацией плюроника 2 моль% при температуре $T=318\text{K}$ представлено на рисунке 34.

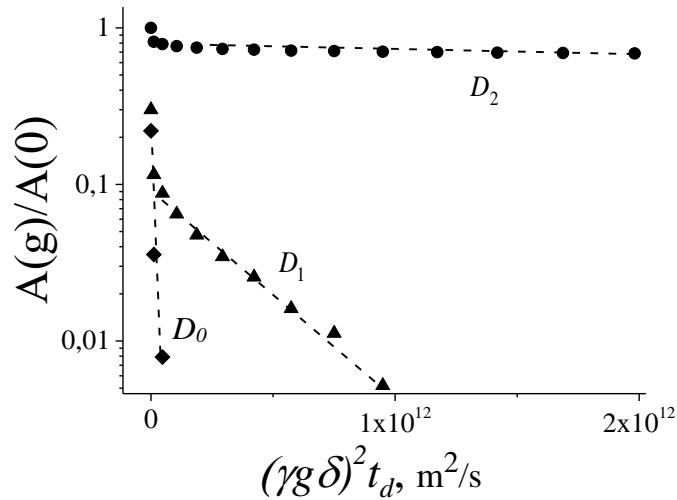


Рисунок 34 – Диффузионное затухание амплитуды сигнала стимулированного эхо для системы ФХ и плюроника с концентрацией плюроника 2 моль% при $T=318\text{K}$ и времени диффузии $t_d = 0,05\text{c}$ (●). На рисунке представлен пример разложения ДЗ (●), пунктирными линиями отмечены КСД (D_0 , D_1 , D_2), подобранные в соответствии с уравнением (30).

Диффузионная зависимость демонстрирует отклонение от однокомпонентного вида, что может свидетельствовать о наличии неоднородностей в системе. Анализ затухания амплитуды спинового эхо осуществлялся в соответствии с выражением:

$$A(g)/A(0) = \sum_i p_i \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 \Delta D_i), \quad (33)$$

где $A(0)$ – начальная амплитуда сигнала эхо, γ – гиромагнитное отношение ядер фосфора, g и δ – амплитуда и длительность импульсов градиента, t_d – время самодиффузии, p_i – «весовой» коэффициент i -ой компоненты, характеризующейся КСД D_i .

При малых значениях градиента наблюдается компонента ДЗ со значением КСД D_0 порядка $10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$. Наличие данной компоненты вероятно связано с движением молекул воды, «связанных» с молекулами фосфатидилхолина. Из данных работы [9] следует, что явление «связанных» молекул воды и фосфатидилхолина может наблюдаться именно в

исследуемой нами области концентраций (концентрация липида в воде 50 вес.%), где происходит расслоение системы на ламеллярную жидкокристаллическую фазу и воду.

Кроме того, в затухании присутствуют еще 2 компоненты со значениями КСД D_1 порядка 10^{-12} м²/с. Наличие D_1 возможно характеризует движение «свободных» мицелл. Образование мицелл в образцах может осуществляться из молекул фосфолипида и/или плуроника. В таком случае медленнозатухающая компонента с КСД D_2 порядка 10^{-15} м²/с, которая наблюдается при больших значениях градиента, вероятно связана с движением мультиламеллярных липидных везикул с включенными молекулами плуроника.

Ниже на рисунке 35 представлены типичные диффузионные затухания амплитуды сигнала стимулированного эха для системы фосфатидилхолина, плуроника и куркумина с концентрацией куркумина 5 моль% при температуре $T=318$ К.

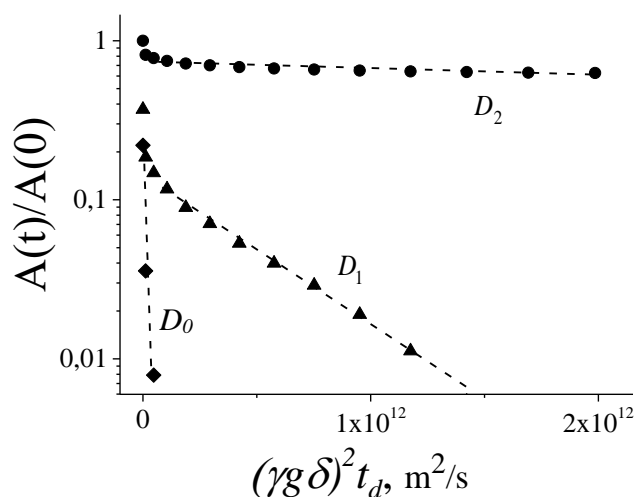


Рисунок 35 – ДЗ амплитуды сигнала стимулированного эха для системы ФХ, плуроника и куркумина 5 моль% при температуре $T=318$ К и времени диффузии $t_d=0,05$ с

Диффузионные зависимости для суспензии ФХ, плуроника и куркумина 5 моль% схожи с ДЗ для суспензии ФХ и плуроника. Они так же

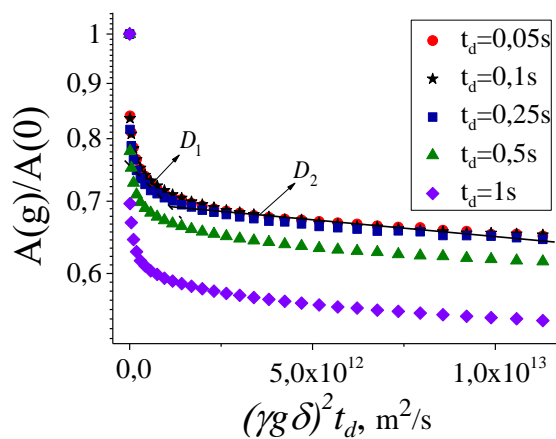
демонстрируют отклонение от экспоненциального вида. Анализ затухания амплитуды спинового эхо осуществлялся в соответствии с выражением (33).

Наличие компоненты КСД D_0 порядка 10^{-10} м²/с вероятно связано с движением молекул воды, «связанных» с молекулами фосфатидилхолина. Наличие D_1 порядка 10^{-12} м²/с возможно характеризует движение «свободных» мицелл, образованных захватом молекул фосфатидилхолина плуроником или захватом молекул куркумина плуроником. Медленно затухающая компонента с D_2 порядка 10^{-15} м²/с, вероятно связана с движением образованных фосфотидилхолином и плуроником мультиламеллярных везикул, нагруженных куркумином.

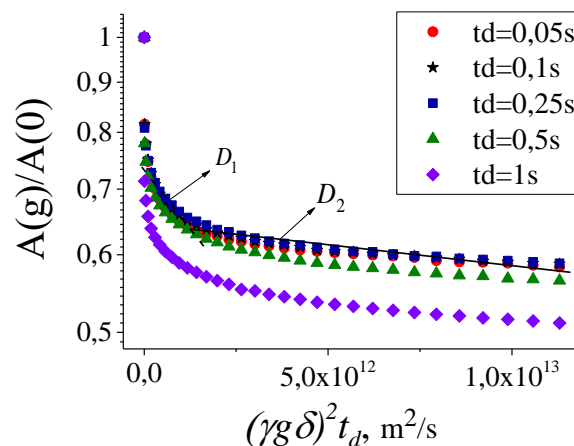
На рисунке 36 представлены диффузионные затухания амплитуды сигнала стимулированного эха для системы фосфатидилхолина и плуроника и систем фосфатидилхолина, плуроника и куркумина с концентрацией куркумина 5, 10 и 15 моль%, полученные при временах диффузии от 50 до 1000 мс при температуре T=318К. Для всех кривых произведение $(\gamma g \delta)^2 t_d$ постоянно.

Диффузионные зависимости суспензии из ФХ и плуроника и суспензий ФХ, плуроника и куркумина различной концентрации при варьировании времени диффузии демонстрируют отклонения от экспоненциального вида схожие с ДЗ суспензии ФХ, плуроника и куркумина 5 моль% при времени диффузии $t_d=0,05$ с. Это свидетельствует о наличии неоднородностей во всех исследуемых системах. Анализ затухания амплитуды спинового эхо осуществлялся в соответствии с выражением (33):

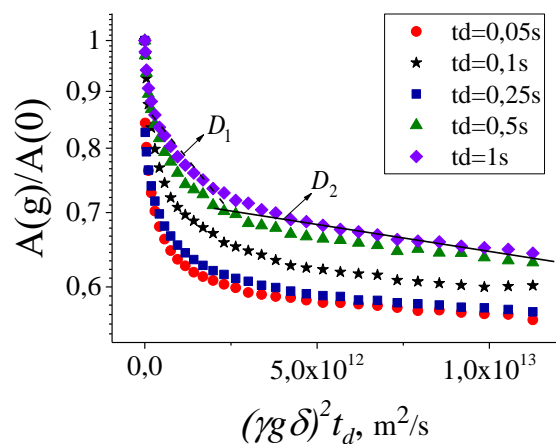
$$A(g)/A(0) = \sum_i p_i \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 \Delta D_i), \quad (33)$$



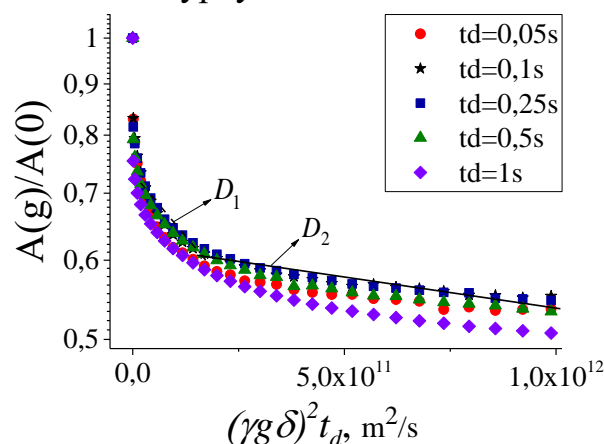
суспензия ФХ и плуроника



суспензия ФХ, плуроника и куркумина 5 моль%



суспензия ФХ, плуроника и куркумина 10 моль%



суспензия ФХ, плуроника и куркумина 15 моль%

Рисунок 36 – Диффузионные затухания, полученные по для суспензии из ФХ и плуроника и суспензий ФХ, плуроника и куркумина с концентрацией куркумина 5, 10 и 15 моль% при временах диффузии от 50 мс до 1000 мс, при $T=318\text{K}$

Для дальнейшего анализа ДЗ рассматривали две компоненты, с различающимися на три порядка коэффициентами самодиффузии, D_1 (быстрозатухающая) порядка $10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$ и D_2 (медленнозатухающая) порядка $10^{-15} \text{ м}^2/\text{с}$.

КСД зависит от гидродинамического радиуса согласно уравнению Стокса-Эйнштейна (14). Для суспензии ФХ и плуроника 2 моль% КСД D_2 при абсолютной температуре раствора $T=318 \text{ K}$ и вязкости чистого растворителя $\eta=0,85 \text{ мПа}\cdot\text{с}$ расчет дает значение гидродинамического

радиуса (74 ± 9) нм, что согласуется с данными работы [1], это подтверждает, что компонента ДЗ со значением КСД D_2 может быть связана с движением мультиламеллярных везикул. Для КСД D_1 , при тех же значениях абсолютной температуры раствора T и вязкости чистого растворителя η , значение гидродинамического радиуса равно (12 ± 7) нм, что соответствует радиусу мицелл из литературы [21].

3.6 Зависимость коэффициентов самодиффузии от времени диффузии

На рисунке 37 представлена зависимость значений коэффициентов самодиффузии D_1 , D_2 от времени диффузии t_d , при $T=318\text{K}$ для суспензии ФХ и плуроника и суспензий ФХ, плуроника и куркумина с концентрацией куркумина 5, 10 и 15 моль%. Значения коэффициентов самодиффузии D_1 , D_2 при различных временах диффузии при температуре $T=308\text{K}$ приведены в таблице 7.

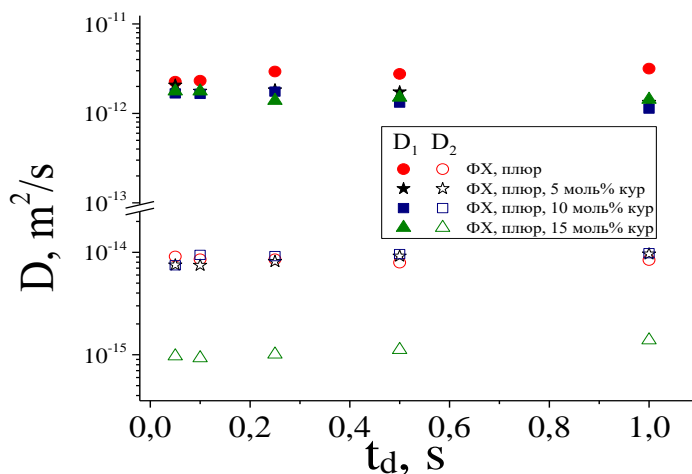


Рисунок 37 – Зависимость значений коэффициентов самодиффузии D_1 , D_2 от времени диффузии t_d , при $T=318\text{K}$

Таблица 7 – Зависимость D_1 и D_2 от времени диффузии t_d

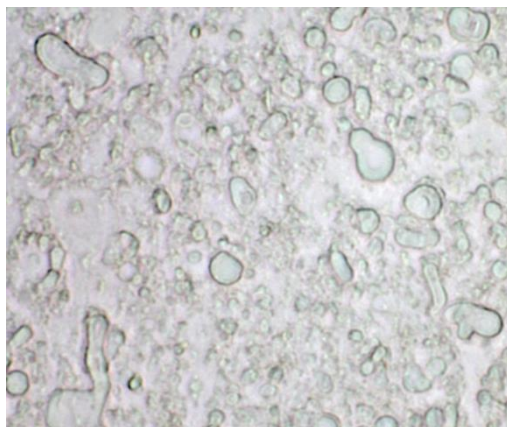
t_d, c	Образец 1 (ФХ, плуроник)	Образец 2 (ФХ, плуроник, 5 моль% куркумина)	Образец 3 (ФХ, плуроник, 10 моль% куркумина)	Образец 4 (ФХ, плуроник, 15 моль% куркумина)	Образец 1 (ФХ, плуроник)	Образец 2 (ФХ, плуроник, 5 моль% куркумина)	Образец 3 (ФХ, плуроник, 10 моль% куркумина)	Образец 4 (ФХ, плуроник, 15 моль% куркумина)
	$D_1 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с} (p_2)$				$D_2 \cdot 10^{-15} \text{ м}^2/\text{с} (p_3)$			
0,05	2,26 (0,09)	2,07 (0,13)	1,67 (0,17)	1,77 (0,19)	9,09 (0,70)	7,51 (0,63)	7,46 (0,60)	0,97 (0,58)
0,1	4,32 (0,09)	1,77 (0,13)	1,65 (0,22)	1,77 (0,19)	8,54 (0,70)	7,46 (0,63)	9,43 (0,66)	0,93 (0,60)
0,25	2,94 (0,08)	1,83 (0,12)	1,75 (0,17)	1,39 (0,17)	8,54 (0,70)	8,13 (0,64)	9,17 (0,62)	1,01 (0,60)
0,5	2,76 (0,08)	1,74 (0,12)	1,32 (0,20)	1,51 (0,16)	7,93 (0,67)	9,17 (0,62)	9,60 (0,70)	1,12 (0,60)
1	3,17 (0,07)	1,33 (0,09)	1,13 (0,19)	1,43 (0,14)	8,40 (0,59)	9,61 (0,56)	9,80 (0,72)	1,39 (0,58)

Как видно из рисунка и данных таблицы зависимость коэффициентов затухания D_1 и D_2 от времен диффузии отсутствует. Это говорит нам об вероятном отсутствии ограничений в трансляционной подвижности как для системы из ФХ и плуроника, так и при добавлении в нее куркумина при температуре $T=318\text{K}$. Однако значения медленнозатухающей компоненты D_2 для суспензии ФХ, плуроника и куркумина 15 моль% имеют более низкие значения, что возможно связано с образованием крупных агломератов при данной концентрации куркумина.

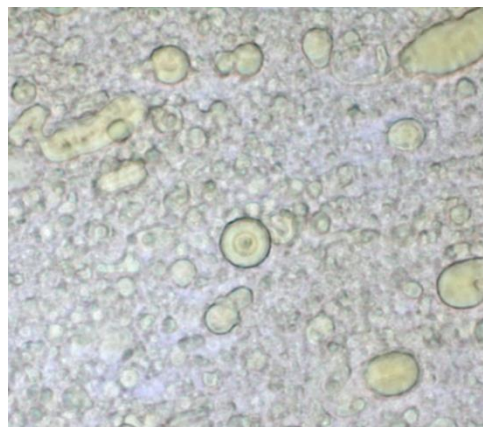
3.7 Оптическая микроскопия и конфокальная флуоресцентная микроскопия в исследовании липид-полимерных систем

В системах на основе липида, плуроника и куркумина с концентрацией 5 и 10 моль%, приведенных на рисунке 38, наблюдается большое количество микроразмерных липосом. Они равномерно окрашены, что свидетельствует об успешном включении куркумина в липидный бислои липосом. В образце при концентрации куркумина 15 моль% так же наблюдается наличие липосом, нагруженных куркумином, однако присутствуют и кристаллоподобные структуры с характерным для

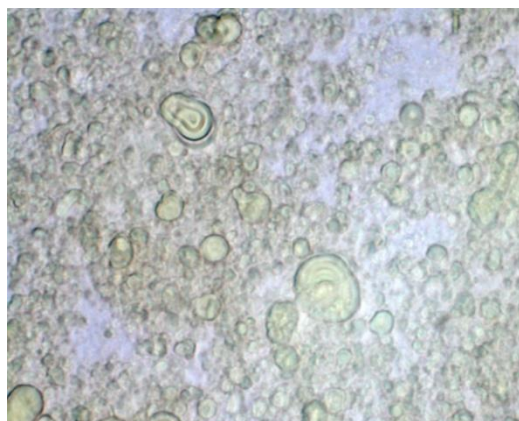
куркумина цветом, что подтверждает предположения о плохой солюбилизации куркумина при концентрации 15% моль.



суспензия ФХ и плуроника



суспензия ФХ, плуроника и куркумина 5 моль%



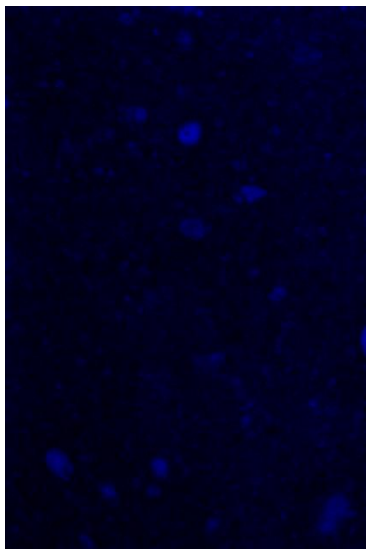
суспензия ФХ, плуроника и куркумина 10 моль%



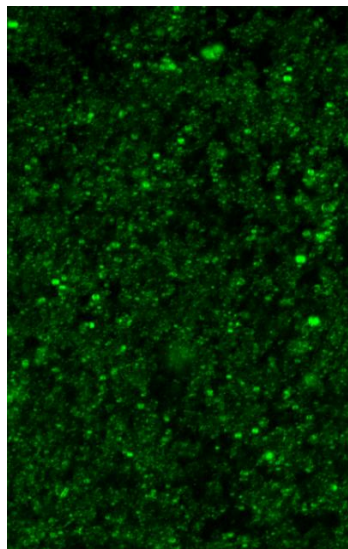
суспензия ФХ, плуроника и куркумина 15 моль%

Рисунок 38 – Изображения микропрепаратов липосом суспензии ФХ и плуроника и суспензий ФХ, плуроника и куркумина 5, 10 и 15 моль% в проходящем свете

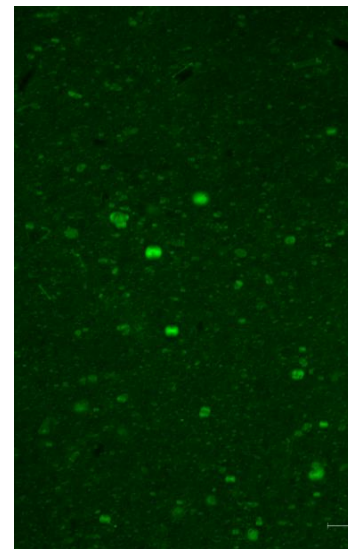
На рисунке 39 представлены данные по конфокальной флуоресцентной микроскопии. Для липид-полимерной системы без куркумина отсутствует флуоресценция, так как эта суспензия не содержит куркумин. В образце с куркумином 5 моль% наблюдается большое количество микроразмерных липосом с куркумином. Для образца с куркумином 15 моль% наблюдается наличие кристаллов куркумина и некоторое количество липосом с куркумином.



суспензия ФХ и
плюроника



суспензия ФХ,
плюроника и куркумина
5 моль%



суспензия ФХ,
плюроника и куркумина
15 моль%

Рисунок 39 – Изображения липосом суспензии ФХ и плюроника и суспензий ФХ, плюроника и куркумина 5 и 15 моль%, полученные методом конфокальной флуоресцентной микроскопии

На рисунке 40 приведено распределение интенсивности свечения куркумина в «разрезе» липосомы размером $\sim 10\mu\text{m}$, наблюдаемой в суспензии ФХ, плюроника и куркумина 5 моль%, от расстояния. Отсчет ведется с левого края липосомы по диаметру. Благодаря флуоресценции куркумина видно, что липосома состоит из двух бислоев, с встроенными равномерно молекулами.

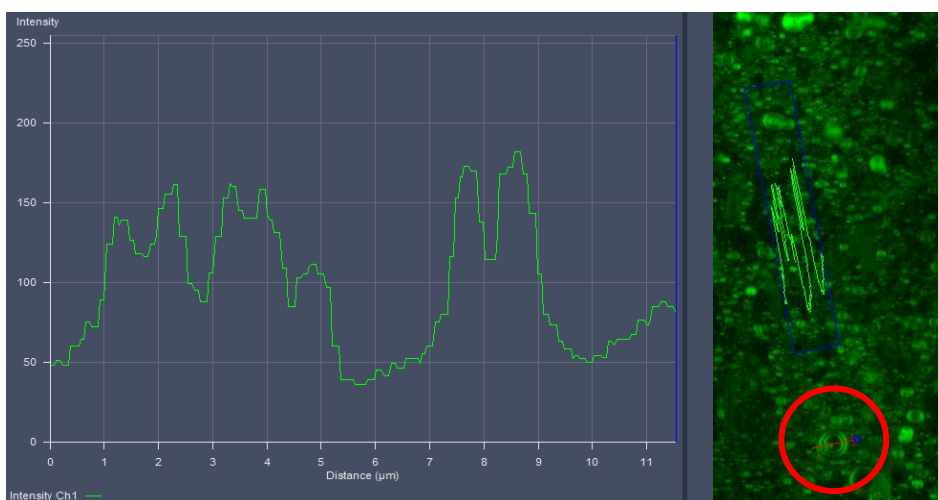


Рисунок 40 – Изображение зависимости интенсивности свечения куркумина в «разрезе» липосомы в образце, содержащем суспензию ФХ, плюроника и куркумина 5 моль%, полученное методом конфокальной флуоресцентной микроскопии

Благодаря данным оптической и конфокальной флуоресцентной микроскопии наблюдается включение куркумина в липидный бислой, наблюдаемых липосом. Показано, что оптимальным способом получения липосом, модифицированных плуроником и нагруженных куркумином является использование концентрации куркумина не выше 10 моль%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом ЯМР проведено исследование особенностей фазового поведения и молекулярной подвижности фосфолипидных систем с плуроником F-127 и различной концентрацией куркумина 5, 10 и 15 моль% в области физиологических температур от 298 до 318 К.

- Анализ спектров ^{31}P ЯМР указывает на наличие в фосфолипидной системе с плуроником и куркумином двух фаз во всем исследуемом температурном диапазоне: ламеллярной жидкокристаллической фазы (область формирования липосом) и фазы, в которой происходит изотропное движение. Наличие изотропной фазы объяснена образованием мицелл из липидов, плуроника F-127 и куркумина.
- По данным ЯМР релаксометрии на ядрах ^1H спады поперечной намагниченности для фосфолипидных систем с плуроником и куркумином обусловлены суммой релаксационных вкладов от мицелл и липосом.
- Данные ЯМР диффузометрии на ядрах ^1H подтвердили предположение о наличии в фосфолипидной системе с плуроником и куркумином «свободных» мицелл (размером ~ 10 нм) и липосом (размером ~ 70 нм).
- По данным оптической и конфокальной флуоресцентной микроскопии наблюдается включение куркумина в липидные бислои.
- Выяснено, что оптимальная концентрация куркумина при загрузке куркумина в липидные липосомы, модифицированных плуроником, должна быть не выше 10 моль%.

Публикация по теме

Созонова Д.А., Халиуллина А.В., Филиппов А.В. Исследование особенностей молекулярной подвижности липосом, состоящих из липидов, плуроника F-127 и куркумина, методом ЯМР// VIII Международный молодежный научный форум «Белые цветы» в г. Казани: сб. тезисов, 2021. – С. 353.

В заключение автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю доценту Халиуллиной А.В. Автор благодарит профессора Филиппова А.В. за ряд ценных советов при обсуждении и обработке экспериментальных данных. Автор выражает благодарность заведующему кафедрой физики молекулярных систем профессору В.Д. Скирде за предоставленную возможность работать на кафедре.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Pluronic modified liposomes for curcumin encapsulation: Sustained release, stability and bioaccessibility / Z. Li, S. Peng, X. Chen [и др.]. – Текст : непосредственный // Food Research International. – 2018.– 34 с.
2. Pluronic F127-modified liposome-containing tacrolimus–cyclodextrin inclusion complexes: improved solubility, cellular uptake and intestinal penetration / Q. Zhua, T. Guoa, D. Xiaa [и др.]. – Текст : непосредственный // Royal Pharmaceutical Society. – 2013. – 11 с.
3. Encapsulation of Curcumin in Pluronic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Applications / S. Abhishek, K. Naresh, G. Pranab, B. Utpal. – Текст : непосредственный // Biomaterials Applications. – 2011. – № 25. – С. 619-639.
4. Барсуков, Л.И. ЛИПОСОМЫ / Л.И. Барсуков. – Текст : непосредственный // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 2-9.
5. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. / D. Lombardo, M. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra. – Текст : непосредственный // Condensed Matter Physics. – 2015. – 22 с.
6. Naeem, S. Liposomes as colloidal nanovehicles: on the road to success in intravenous drug delivery / S. Naeem, G. Viswanathan, M.B. Misran. – Текст : непосредственный // Reviews in Chemical Engineering. – 2018. – Т. 34, N. 3. – С. 365-383.
7. Drug Approvals and Databases. – Текст : электронный // FDA Database U.S. : [сайт]. – URL : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm> (дата обращения 10.02.2021).
8. Bodratti, A.M. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery / A.M. Bodratti. – Текст : непосредственный // Functional Biomaterials. – 2018. – 24 с.

9. Миттел, К. Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии / К. Миттел. – Текст : непосредственный // Мир. – 1980. – 598 с.
10. Гафуров, И.Р. Самодиффузия и гелеобразование в растворах желатина и триацетата целлюлозы : 01.04.14 – Теплофизика и теоретическая теплотехника : дисс. на соискание ученой степени канд. физ.-мат. наук / Гафуров Ильшат Рафкатович. – Казань, 1989. – 185 с. – Текст : непосредственный.
11. NMR relaxation and self-diffusion in aqueous micellar gels of pluronic F-127 / M. Shaikhullina, A. Khaliullina, R. Gimatdinov [и др.]. – Текст : непосредственный // Journal of Molecular Liquids. – 2020. – № 306. – С. 112898.
12. Samanta, S. Interaction of Curcumin with PEO–PPO–PEO Block Copolymers: A Molecular Dynamics Study / S. Samanta, D. Roccatano – Текст : непосредственный // ACS. – 2013. – С. 3250-3257.
13. Фаррар, Т. Импульсная и Фурье-спектроскопия ЯМР : учебник / Т. Фаррар, Э. Беккер. – Москва : Мир, 1973. – 164 с. – Текст : непосредственный.
14. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения – Текст : электронный // ChemNet Россия : [сайт] – Москва, 2003 – URL: <http://www.chem.msu.su/rus/teaching/ustyniuknmrlectures/Lecture1.pdf>. (дата обращения: 01.05.2021).
15. Маклаков, А.И. Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров : учебник / А.И. Маклаков, В.Д. Скирда, Н.Ф. Фаткуллин. – Казань : Изд-во КГУ, 1987. – 224 с. – Текст : непосредственный.
16. Хеберлен, У. ЯМР высокого разрешения в твердых телах : учебник / У. Хеберлен, М. Меринг. – Москва : Мир, 1980. – 504 с. – Текст : непосредственный.
17. ³¹P NMR Spectroscopy of Phospholipids: From Micelles to Membranes. [Text] / J. Schiller, M. Muller, B. Fuchs [et.al.]. – Текст :

- непосредственный // Current analytical chemistry. – 2007. – N. 3. – С. 283-301.
18. Мухитов, А.Р. Современная световая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях : пособие / А.Р. Мухитов, С.С. Архипова, Е.Е. Никольский – Москва : Наука, 2011. – 162 с. – Текст : непосредственный.
19. Effect of dynamic high pressure microfluidization on structure and stability of pluronic F127 modified liposomes / Z. Li, S. Peng, X. Chen [и др.]. - Текст : непосредственный // Journal of Dispersion Science and Technology. – 2019. – V. 40, N. 7. – С. 982-989.
20. Биологические мембраны – Текст : электронный // ChemNet Россия : [сайт] – Москва, 2003 – URL: <http://www.chem.msu.ru/ru0s/books/ovchinnikov/p547-636.pdf>. (дата обращения: 01.04.21).
21. Johnsson M. Liposomes, Disks, and Spherical Micelles: Aggregate Structure in Mixtures of Gel Phase Phosphatidylcholines and Poly(Ethylene Glycol)-Phospholipids / M. Johnsson, K. Edwards. – Текст : непосредственный // Biophysical Journal. – 2003. – V. 85. – С. 3839-3847.