



Научная статья

DOI 10.15593/RZhBiomeh/2024.2.12

УДК 531/534: [57+61]

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ЛИПОСОМ СОДЕРЖАЩИХ КАЛЬЦИЙ

Т.Дж. Мдзинарашвили, М.М. Хведелидзе, Э.Р. Шекиладзе, С.В. Чинчаладзе,
М.Т. Мдзинарашвили

¹ Тбилисский государственный университет имени И. Джавахишвили, Тбилиси, Грузия

О СТАТЬЕ

Получена: 21 февраля 2024
Одобрена: 1 июня 2024
Принята к публикации: 14 июня 2024

Ключевые слова:

калориметрия, сложные
наночастицы, липосомы, кальций

АННОТАЦИЯ






Проведено калориметрическое и спектроскопическое исследование липосом с добавлением кальция и без него, полученных с помощью двух фосфолипидов (дипальмитоилфосфатидилхолин (*DPPC*) и 1-пальмитоил-2-линолеил-фосфатид (*DPPA*)). Липосомы размером 200 нм были приготовлены по новой технологии. В качестве кальцийсодержащих молекул был использован CaCO_3 , который в медицине применяется как кальциевая добавка или как препарат от повышенной кислотности желудка. Липосомы были приготовлены в воде и в 20%-ном глицериновом растворе. Как калориметрические, так и спектроскопические эксперименты показали, что приготовленные по новой технологии кальцийсодержащие молекулы инкорпорируются в структурах липосом, что предоставляет возможность их использования в лечебных целях. Также необходимо отметить, что в таких липосомах кальций размещается в больших количествах и его попадание в кровоток не вызывает побочных эффектов. В работе была показана структура и термостабильность комплексных липосом. Полученные в ходе экспериментов кальцийсодержащие наночастицы могут быть как униламеллярными, так и мультламеллярными. Их состояние зависит от типа фосфолипида и от среды, в которой липосомы получены. Липосомы, приготовленные в воде и в глицерине на основе *DPPC* фосфолипида, получились мультламеллярными. Липосомы без добавки кальция, приготовленные на основе *DPPA* фосфолипида в воде, получились униламеллярными, а с кальцием – мультламеллярными. Липосомы, приготовленные на основе *DPPA* фосфолипида в глицерине, не зависимо от наличия в них кальция, получились мультламеллярными. Кальцийсодержащие липосомы при успешном испытании на животных можно будет рекомендовать для людей, страдающих гиперкальциемией.

Введение

На сегодняшний день болезни, связанные с костными тканями, представляют собой большую

проблему как в социальном, так и в экономическом аспекте. Чаще всего эти проблемы коррелируют с возрастом человека. Известно, что пожилые люди страдают остеопорозом и остеопенией. Если учесть,

- © Мдзинарашвили Тамаз – профессор, e-mail: tamaz.mdzinarashvili@tsu.ge
- © Хведелидзе Мариам – доцент, e-mail: mariam.khvedelidze@tsu.ge
- © Шекиладзе Эка – доцент, e-mail: eka.shekiladze@tsu.ge
- © Чинчаладзе Саломе – аспирант, e-mail: salomechinchaladze@outlook.com
- © Мдзинарашвили Мариам – аспирант, e-mail: mariam.mdzinarashvili1@gmail.com

 0000-0002-4311-779X
 0000-0001-5691-1880
 0000-0002-3985-1334
 0000-0002-0689-2674
 0000-0001-9156-6306



что за последние десятилетия наблюдается тенденция к увеличению продолжительности жизни населения, то, соответственно, количество таких заболеваний возрастает. Вдобавок лечение заболеваний костных тканей является продолжительным, что влияет как на качество жизни пациента, так и на затраты системы здравоохранения [1–5]. Поэтому актуальной задачей является создание таких препаратов, которые целенаправленно и максимально быстро смогут восполнить дефицит кальция в организме. С другой стороны, известно, что применение кальция в больших дозах не решает эту проблему. Причиной является увеличение концентрации кальция в крови, что вызывает ряд побочных эффектов, например панкреатит, высокое артериальное давление, возникновение камней в почках [6–8]. Также гиперкальциемия препятствует нормальной деполяризации сердечной мышцы что является причиной аритмии и слабости в мышцах. Также повышение кальция в крови вызывает понижение объема эритроцитов, что в свою очередь, влечет за собой развитие анемии. Гиперкальциемия может привести к увеличению количества красные кровяные клеток, которые способствуют коагуляции крови и возникновению тромбов [2, 9]. Инициатором этого является высокая концентрация кальция в крови [10, 11]. Из вышеперечисленного следует, что для лечения гиперкальциемии человека важно создание таких препаратов, которые, с одной стороны, восполняют дефицит кальция, а с другой стороны, не вызовут возникновения опасных для жизни человека побочных эффектов. Это возможно реализовать при использовании липосом, внутри которых инкорпорирован кальций в больших концентрациях.

Липосомы в основном состоят из двуслойных липидов, состав которых аналогичен составу клеточных мембран, вследствие чего у них хорошая биосовместимость. Благодаря использованию таких липосом возможна целенаправленная доставка ионов кальция в ткани без увеличения концентрации кальция в крови [12, 13]. Именно поэтому наши исследования сфокусированы на создании таких комплексных наночастиц, которые способны в нужных количествах доставить кальций непосредственно в поврежденную кость, избегая негативных эффектов [14–17].

Самые распространенные липосомы состоят из фосфолипидов, которые, в свою очередь, состоят из амфифильных молекул фосфатидилхолина. Для его структуры характерно наличие двух пар гидрофобных ацильных углеводородных цепей, которые с помощью глицерола связываются с полярными гидрофильными головками близлежащих липидов [18–22].

В наших экспериментах использовались дипальмитойлфосфатидилхолин (*Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine DPPC*) и 1-пальмитойл-2-линолеойл-фосфатид (*Dipalmitoyl-sn-glycero-3-*

phosphatidic acid DPPA) фосфолипиды в качестве транспортных средств доставки препарата.

При инкорпорировании гидрофобных лекарственных средств в липосомы окончательный продукт становится растворимым в воде, что является важным свойством. В качестве препарата кальция нами был выбран CaCO_3 , который является бесцветным, безвкусным и не растворимым в воде веществом. Карбонат кальция является ионным соединением, который в медицине используется как кальциевая добавка для восполнения дефицита кальция в крови, как антацид против изжоги и повышенной кислотности желудка [23–25]. Поэтому изучение кальцийсодержащих комплексных наночастиц важно.

Структура и стабильность кальцийсодержащих комплексных липосом отслеживалась с использованием дифференциального сканирующего микрокалориметра (*DSC*) [26–28].

Методы приготовления *DPPA* и *DPPC* липосом

В экспериментах были использованы липосомы, приготовленные с использованием новой технологии [29]. Липосомы готовились из двух типов фосфолипидов. *DPPA* и *DPPC* фосфолипиды были поставлены компанией *Lipoid (Newark, New Jersey)*. Для их получения использовалась одна и та же технология [5]. Поскольку для целенаправленной доставки лекарственных средств эффективны наночастицы диаметром 200 нм, были приготовлены липосомы шириной 5 нм и диаметром 200 нм. Было установлено, что для приготовления одной липосомы шириной 5 нм и диаметром 200 нм необходимо $3,3 \times 10^4$ штук липидов. В представленной работе использовался высокочувствительный дифференциальный сканирующий микрокалориметр *DASM-4(DSC)* (Пушино, Россия).

Экспериментальная часть

Калориметрические эксперименты проводились на *DPPA* и *DPPC*-липосомах с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды и 20%-ного глицерина как в случае чистых липосом, так и в случае комплексных липосом с инкорпорированным карбонатом кальция. С целью установления термостабильности был выбран температурный интервал в пределах 0°C – 100°C и скорость температурного сканирования – $2^\circ\text{C}/\text{мин}$. Калориметрические измерения, проведенные на *DPPA*-липосомах с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды, показаны на рис. 1, а. С использованием в качестве растворителя 20%-ного глицерина – на рис. 2.

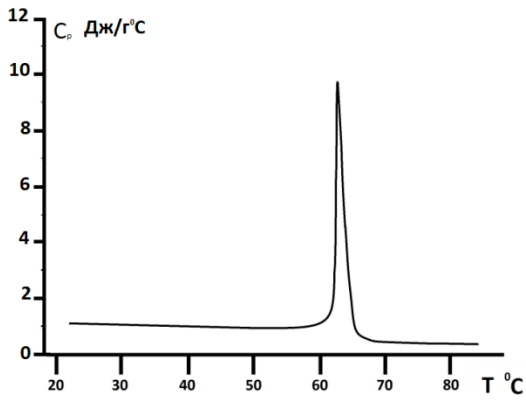


Рис. 1. Зависимость теплоемкости от температуры для *DPPA*-липосом с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды. Скорость температурного сканирования $V=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$

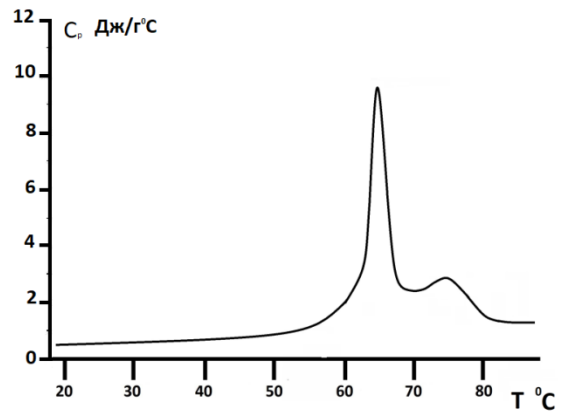


Рис. 2. Зависимость теплоемкости от температуры для *DPPA*-липосом с использованием в качестве растворителя 20%-ного глицерина. Скорость температурного сканирования $V=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$

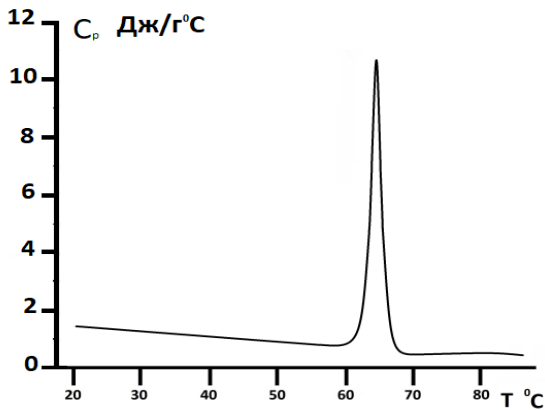


Рис. 3. Зависимость теплоемкости от температуры суспензии *DPPA* комплексных липосом с инкорпорированным карбонатом кальция с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды. Скорость температурного сканирования $V=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$

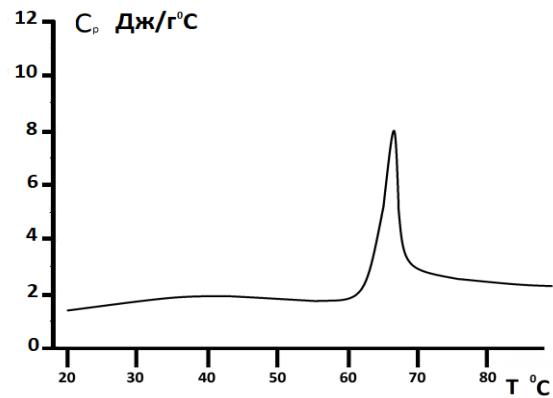


Рис. 4. Зависимость теплоемкости от температуры суспензии *DPPA* комплексных липосом с инкорпорированным карбонатом кальция с использованием в качестве растворителя 20%-ного глицерина. Скорость температурного сканирования $V=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$

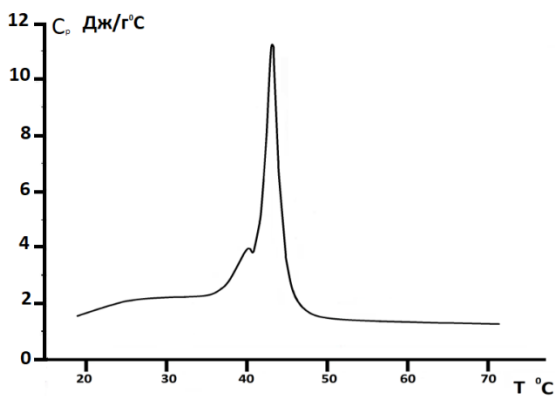


Рис. 5. Зависимость теплоемкости от температуры для *DPPC*-липосом с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды. Скорость температурного сканирования $V=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$

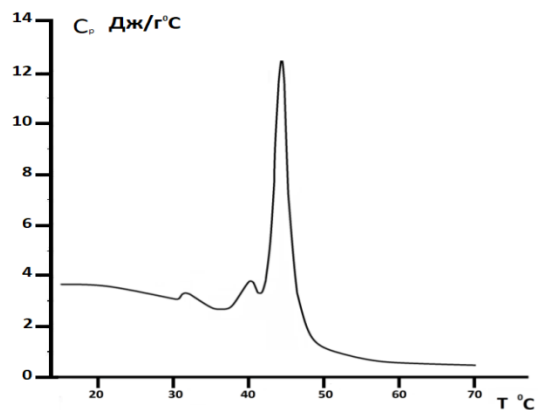


Рис. 6. Зависимость теплоемкости от температуры для *DPPC*-липосом с использованием в качестве растворителя 20%-ного глицерина. Скорость температурного сканирования $V=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Опираясь на калориметрические измерения, было вычислено количество тепла, выделяемое из *DPPA*-липосом в результате тепловой денатурации. Оказалось, что для *DPPA*-липосом, приготовленных с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды, теплота денатурации составляет 21,2 МДж. Что касается *DPPA* –липосом с использованием в качестве растворителя 20%-ного глицерина, то в этом случае в результате тепловой денатурации выделенное тепло составило 25,3 МДж.

Также эксперименты были проведены на *DPPA* комплексных липосомах с инкорпорированным карбонатом кальция с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды (рис. 3) и 20%-ного глицерина (рис. 4).

Изучение кривых зависимости теплоемкости от температуры при плавлении *DPPA*-липосом дает возможность определить структуру липосом. Особое внимание необходимо уделить калориметрическому исследованию *DPPA*-липосом с инкорпорированным кальцием в 20%-ного глицериновом растворителе. Как показывают калориметрические измерения, чистые *DPPA*-липосомы, растворенные в 20%-ного глицериновом растворителе, являются многослойными мультислойными структурами, на что указывает существование двух пиков на калориметрических кривых (см. рис. 2). В отличие от чистых *DPPA* липосом, *DPPA* комплексные липосомы с инкорпорированным карбонатом кальция имеют только один главный пик плавления, а второй маленький пик исчезает, это указывает, что ионы кальция точно установили связь с *DPPA* липидами (см. рис. 4).

Основываясь на калориметрических измерениях, было определено количество теплоты, которое выделилось в результате плавления *DPPA*-липосом, содержащих кальций карбонат, растворенных как в воде, так и в 20%-ного глицерине. Выделенное тепло в обоих случаях оказалось отличным от такового *DPPC* комплексных липосом. Оказалось, что для *DPPA* комплексных липосом, содержащих кальция карбонат, приготовленных с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды, теплота денатурации составляет 18,6 МДж, в то время как для *DPPA* комплексных липосом, содержащих кальция карбонат, при использовании в качестве растворителя 20%-ного глицерина, выделенное тепло составило 13,5 МДж.

Также калориметрические измерения были проведены на *DPPC*-липосомах с использованием аналогичных растворителей (рис. 5, 6).

С помощью калориметрических измерений было определено то количество тепла, которое выделилось из *DPPC*-липосом в результате тепловой

денатурации. Оказалось, что для *DPPC*-липосом, приготовленных с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды, теплота денатурации составляет 23,6 МДж. Для *DPPC*-липосом с использованием в качестве растворителя 20%-ного глицерина количество выделенного тепла составило 25,4 МДж.

Также калориметрические измерения были проведены на *DPPC* комплексных липосомах с инкорпорированным карбонатом кальция с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды (рис. 7) и 20%-ного глицерина (рис. 8).

Калориметрические эксперименты показали, что, в отличие от *DPPA*-липосом, *DPPC*-липосомы, приготовленные как в воде, так и в глицериновом растворителе как в чистом виде, так и при инкорпорировании карбоната кальция, сохраняют мультислойную структуру (см. рис. 5–8).

Основываясь на калориметрических измерениях, было рассчитано количество теплоты, которое выделилось в результате плавления *DPPC*-липосом, содержащих кальция карбонат, приготовленных как в воде, так и в 20%-ного глицерине. Выделенное тепло в обоих случаях разное. Оказалось, что для *DPPC*-липосом комплексных, содержащих кальция карбонат, приготовленных с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды, теплота денатурации составляет 15,0 МДж, в то время как для *DPPC* комплексных липосом, содержащих кальция карбонат, при использовании в качестве растворителя 20%-ного глицерина в результате тепловой денатурации выделенное тепло составило 18,0 МДж.

Факт, что кальций карбонат в действительности образует связи с *DPPA* и *DPPC*-липосомами как в воде, так в глицериновом растворителе, кроме калориметрических экспериментов, был подтвержден и на проведенных спектрофотометрических экспериментах. На рис. 9 показаны кривые зависимости поглощения от длины волны для чистых *DPPA*-липосом и при инкорпорировании ионов кальция.

Спектрофотометрические измерения также проведены на *DPPC*-липосомах. На рис. 10 показаны кривые зависимости поглощения от длины волны для чистых *DPPC*-липосом, приготовленных в бидистиллированной воде, и комплексных *DPPC*-липосом, содержащих ионы кальция.

На спектрофотометрических кривых в случае чистых *DPPA* и *DPPC* при длине волны 235 нм наблюдается небольшой пик поглощения, который исчезает при создании кальций содержащих комплексных липосом. Это указывает, что кальция карбонат действительно создал комплексы с липосомами, приготовленными из *DPPA* и *DPPC*-липидов.

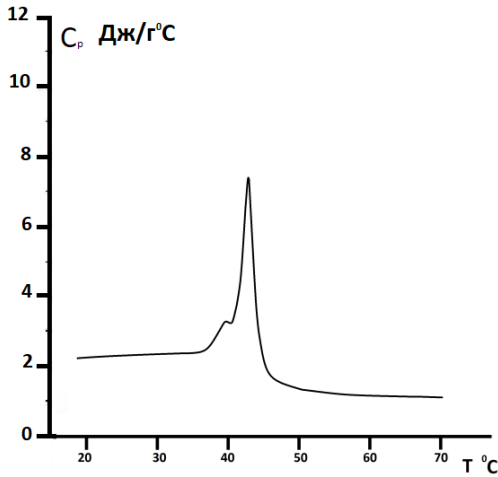


Рис. 7. Зависимость теплоемкости от температуры суспензии *DPPC* липосом комплексных с инкорпорированием карбоната кальция с использованием в качестве растворителя бидистиллированной воды. Скорость температурного сканирования $V=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$

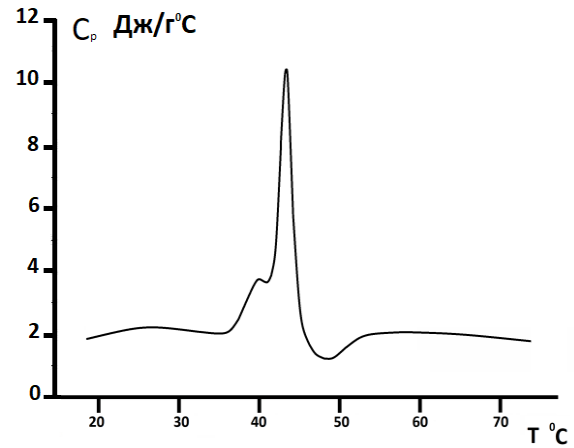


Рис. 8. Зависимость теплоемкости от температуры суспензии *DPPC* липосом комплексных с инкорпорированием карбоната кальция с использованием в качестве растворителя 20%-ного глицерина. Скорость температурного сканирования $V=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$

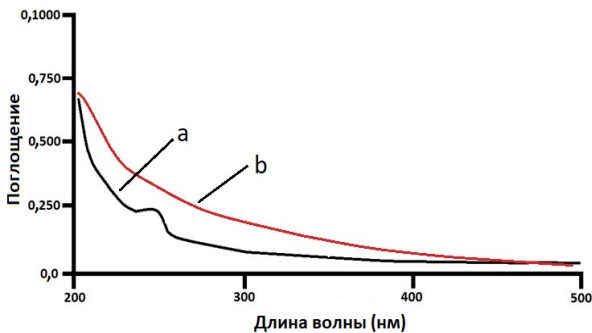


Рис. 9. Зависимость поглощения от длины волны для суспензии чистых *DPPA*-липосом и при инкорпорировании ионов кальция. Растворитель – бидистиллированная вода, *a* – чистые *DPPA*-липосомы, *б* – комплексные *DPPA*-липосомы, содержащие ионы кальция

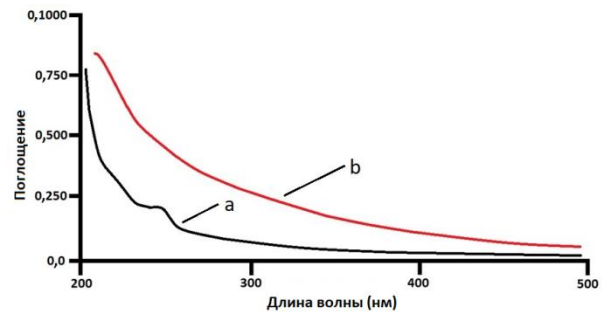


Рис. 10. Зависимость поглощения от длины волны для суспензии чистых *DPPC*-липосом и при инкорпорировании ионов кальция. Растворитель – бидистиллированная вода: *a* – чистые *DPPC*-липосомы, *б* – комплексные *DPPC*-липосомы, содержащие ионы кальция

Обсуждение

Необходимо отметить, что пики поглощения, наблюдаемые на калориметрических записях, являются результатом разрыва водородных связей, существующих между гидрофильными головками фосфолипидов, протекающем при нагреве калориметрической ячейки с образцом. В частности, разрыв связи происходит между группой $O=P-OH$ одного фосфолипида и группой $C=O$ другого фосфолипида. Из проведенных нами исследований видно, что в случае чистых липосом, приготовленных из *DPPA*-липидов плавление упорядоченной структуры происходит на 24°C выше, чем в случае чистых липосом, приготовленных из *DPPC* липидов (см. рис. 1, 2, 5, 6). Если учесть тот факт, что длина

фосфолипидных цепей и состав у *DPPC* и *DPPA* одинаковый, ясно, что различие в температуре фазового перехода у этих липидов должно быть обусловлено различием сил взаимодействия, существующих между их головками. Энергия водородных связей между головками *DPPA*-липидов больше, чем энергия водородных связей между головками *DPPC*-липидов, так как головки *DPPA*-липидов меньше по размеру, чем головки *DPPC*-липидов [4], что дает возможность гидрофильным головкам *DPPA*-липидов сблизиться друг с другом. Это в свою очередь, обуславливает, что длина водородных связей, существующих между головками *DPPA*-липидов, меньше, чем длина водородных связей, существующих между головками *DPPC*-липидов. В то же время сильные водородные связи являются

причиной того, что структура чистых *DPPA*-липосом будет однослойной, то есть униламеллярной, что подтверждается калориметрическими измерениями *DPPA*-липосом, приготовленных в бидистиллированной воде, в которых пик поглощения является узким (см. рис. 1). Что касается *DPPC*-липосом, их структура может быть многослойной, то есть мультиламеллярной, при которой возможно возникновение дополнительных новых водородных связей между существующими внутри липосом слоями. Это подтверждается формой калориметрических пиков теплопоглощения, которое в случае *DPPC*-липосом не является кооперативным, и их главный пик фазового перехода содержит так называемые препики, которые, по нашим соображениям, обусловлены ультиламеллярной структурой *DPPC*-липосом (см. рис. 5).

В случае *DPPC* и *DPPA*-липосом, приготовленных в 20%-ного растворе глицерина, энергия водородных связей сильнее, чем у *DPPC* и *DPPA*-липосом, приготовленных в дистиллированной воде, так как глицерин способствует возникновению дополнительных водородных связей между головками и хвостами *DPPC* и *DPPA*-липидов. Из-за этих связей они способны образовывать многослойные, мультиламеллярные структуры, и устанавливать связи между соседними слоями.

Калориметрические кривые *DPPA*-липосом, приготовленных в 20%-ного растворе глицерина, вместо кооперативных становятся некооперативными, и дополнительно возникает небольшой пик в интервале 75°C (см. рис. 2), причиной которого могут быть дополнительные водородные связи, которые глицерин устанавливает с *DPPA*-липидами. Эти водородные связи являются более сильными, чем водородные связи между самими липидами. Из литературных данных известно, что при добавлении глицерина к *DPPC*-липидам изменяется угол наклона липидных цепей так, что они располагаются параллельно друг относительно друга [30, 31], что им дает возможность сильнее сблизиться. Поэтому, в отличие от *DPPC*-липосом, приготовленных в воде, в этом случае возникают более сильные водородные связи, что, в свою очередь, определяет количество тепла, выделенного после термического плавления *DPPA*-липосом.

Из литературы также известно, что ионы кальция связываются с фосфатными группами во всех типах фосфолипидов [32–37]. Поэтому получается, что кальций конкурирует с фосфолипидами в образовании водородных связей [38, 39]. В присутствии кальция не все фосфолипиды способны образовывать водородные связи, в результате чего выделенное ими количество тепла меньше, чем в случае чистых липосом.

Структура комплексных липосом, содержащих карбонат кальция, приготовленных в глицериновом растворителе, иная, чем структура чистых липосом, приготовленных в глицериновом растворителе, так как

кальций конкурирует с теми дополнительными водородными связями, которыми глицерин связывается с *DPPC* и *DPPA*-липидами. В результате в полученной структуре количество фосфолипидных слоев уменьшено, как в случае *DPPA*-липидов, так и в случае *DPPC* липидов. Это подтверждается калориметрическими экспериментами (см. рис. 4, 8), в соответствии с которыми у кальцийсодержащих комплексных *DPPA*-липосом, приготовленных в глицериновом растворителе, наблюдается один пик, в отличие от чистых *DPPA*-липосом, приготовленных в глицериновом растворителе (см. рис. 2). Из выше приведенного можно заключить, что, в отличие от чистых *DPPA*-липосом, приготовленных в глицериновом растворителе, $CaCO_3$ -содержащие комплексные *DPPA*-липосомы, приготовленных в глицериновом растворителе, образуют униламеллярную структуру (см. рис. 4). Что касается $CaCO_3$ -содержащих комплексных *DPPC*-липосом, приготовленных в глицериновом растворителе (рис. 8), в отличие от чистых *DPPC*-липосом, приготовленных в глицериновом растворителе (см. рис. 7), калориметрические эксперименты показывают наличие кроме главного пика только один дополнительный препик. В связи с этим можно предположить, что количество слоев, по сравнению с чистыми липосомами, в случае $CaCO_3$ -содержащих комплексных *DPPC*-липосом меньше.

Кроме калориметрических экспериментов, образование комплексов между липосомами и карбонатом кальция подтверждается спектрофотометрическими исследованиями. Такое заключение можно сделать, наблюдая на спектрофотометрических записях существующий на длине волны 235 нм пик поглощения в случае *DPPA* и *DPPC*, чистых липосом, который исчезает у кальцийсодержащих комплексных липосом обоих типов, это указывает, что карбонат кальция действительно установил связи с *DPPA* и *DPPC*-липосомами.

Заключение

По форме пика теплопоглощения при плавлении макромолекул возможно судить об упорядоченной структуре макромолекул. Основываясь на полученных экспериментальных результатах, можно определить структуру липосом. В частности, кооперативный и узкий пик фазового перехода плавления липосом указывает, что мы имеем дело с разрывами однотипных связей в структуре липосом под воздействием температуры. В то время как несколько пиков и/или увеличение ширины пика поглощения на полувысоте температурного перехода указывает, что имеем дело с некооперативным процессом. В проведенных экспериментах температурное плавление *DPPA*-

липосом является кооперативным (ширина пика на полувысоте которого $1,8^{\circ}\text{C}$), в случае кальцийсодержащих комплексных DPPA-липосом имеется несколько пиков, то есть плавление является не кооперативным. Вышеприведенное дает возможность заключить, что DPPA-липосомы являются одной двуслойной униламеллярной наночастицей. Структура кальцийсодержащих комплексных DPPA-липосом является многослойной, на что указывает тот факт, что количество пиков

теплопоглощения увеличивается до двух. Можно заключить, что структура кальцийсодержащих комплексных DPPA и DPPC-липосом является многослойной мультиламеллярной структурой. Мультиламеллярная структура, с другой стороны, дает возможность размещения внутри наночастицы большого количества кальция карбоната. Соответственно, использование таких наночастиц с лечебной точки зрения должно быть эффективным и не имеет побочных эффектов.

Список литературы

1. Calcium carbonate / M.M. Al Omari, I.S. Rashid, N.A. Qinna, A.M. Jaber, A.A. Badwan. // *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* – 2016. – No. 41. – P. 13–31.
2. Balmayor, E.R. Gene therapy for bone engineering / E.R. Balmayor, M. van Griensven // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2015. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00009
3. Nordin, B.E. Calcium and osteoporosis / B.E. Nordin // *Nutrition.* – 1997. – no. 13. – P. 466–486.
4. Nordin, B.E. The calcium deficiency model for osteoporosis / B.E. Nordin, H.A. Morris // *Nutr. Rev.* – 1989. – No. 47. – P. 65–72.
5. Management of hypoparathyroidism: present and future / J.P. Bilezikian, M.L. Brandi, N.E. Cusano, M. Mannstadt, L. Rejnmark, R. Rizzoli, M.R. Rubin, K.K. Winer, U.A. Liberman, J.T. Potts // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2016. – No. 101. – P. 13–24.
6. Atomic view of calcium-induced clustering of phosphatidylserine in mixed lipid bilayers. / J.M. Boettcher, R.L. Davis-Harrison, M.C. Clay, A.J. Nieuwkoop, Y.Z. Ohkubo, E. Tajkhorshid, J.H. Morrissey, C.M. Rienstra // *Biochemistry.* – 2011. – no. 29. – P. 2264–2273.
7. Bose, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering / S. Bose, S. Tarafder // *Acta Biomater.* – 2012. – No. 8. – P. 1401–1421.
8. Carrick, A.I. Rapid fire: hypercalcemia / A.I. Carrick, H.B. Costner // *Emerg. Med. Clin. North. Am.* – 2018. – No. 36. – P. 549–555.
9. Osteotropic nanoscale drug delivery systems based on small molecule bone-targeting moieties / E.J. Carbone, K. Rajpura, B.N. Allen, E. Cheng, B.D. Ulery, K.W.H. Lo // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, And Medicine.* – 2017. – No. 13. – P. 37–47.
10. Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery / H. Cheng, A. Chawla, Y. Yang, Y. Li, J. Zhang, H.L. Jang, A. Khademhosseini // *Drug Discovery Today.* – 2017. – No. 22. – P. 1336–1350.
11. Chiu, M.H. Differential scanning calorimetry: an invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions / M.H. Chiu, E.J. Prenner // *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences.* – 2011. – No. 3. – P. 39–59.
12. Cullis, Pt. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes / Pt. Cullis, B. De. Kruijff // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – Vol. 559, no. 4. – P. 399–420.
13. A model of hydrogen bond formation in phosphatidylethanolamine bilayers / A. David, A. Pink, McNeil A. Stew, A. Bonnie Quinn, J. Martin, B. Zuckermann // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes.* – 1998. – Vol. 1368, no. 2. – P. 289–305.
14. Shekiladze, E. Calorimetric study the stability of DPPC liposomes and C and E vitamins complexes / T. Mdzinarashvili, M. Khvedelidze // *Experimental and Clinical medicine.* – 2017. – Vol. 2. – P. 71–73.
15. Bone diseases: current approach and future perspectives in drug delivery systems for bone targeted therapeutics / G. Chindamo, S. Sapino, E. Peira, D. Chirio, M.C. Gonzalez, M. Gallarate // *Nanomaterials.* – 2020. – Vol. 10, no. 5. – P. 875–883.
16. Grigore, M.E. Drug delivery systems in hard tissue engineering / M.E. Grigore // *J. Biotechnol. Biomed. Eng.* – 2018. – Vol. 1. – P. 1001–1006.
17. Exhibit different biopharmaceutical profiles in vitro / M. Haghi, M. Bebawy, P. Colombo, B. Forbes, D.A. Lewis, R. Salama, D. Traini, P.M. Young // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2014. – Vol. 86. – P. 38–45.
18. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications / H. Nsairat, D. Khater, U. Saye, F. Odeh // *Heliyon.* – 2022. – Vol. 8, no. 5. – P. 09394.
19. Huster, D. Strength of Ca (2+) binding to retinal lipid membranes: consequences for lipid organization / D. Huster, K. Arnold, K. Gawrisch // *J. Biophys.* – 2000. – Vol. 78. – P. 3011–3018.
20. John, P. Bilezikian. Primary Hyperparathyroidism. // *J. Clin. Endocrinol Metab.* – 2018. – Vol. 103, no. 11. – P. 3993–4004.
21. The effects of calcium supplementation to patients with primary hyperparathyroidism and a low calcium intake / R. Jorde, K. Szumlas, E. Haug, J. Sundsfjord // *Eur. J. Nutr.* – 2002. – Vol. 41, no. 6. – P. 258–63.
22. Ke Ren, A.D. Drug delivery strategies for treating osteoporosis / A.D. Ke Ren // *Orthop. Muscular Syst.* – 2014. – Vol. 2. – P. 8–11.
23. Kuck, L. Calcium dynamically alters erythrocyte mechanical response to shear. / L. Kuck., J.N. Peart, M.J. Simmonds // *Biochimica et Biophysica.* – 2020. – Vol. 1867. – P. 11–17.
24. Liu, B. Highly purified scavenger receptor class b, type i reconstituted into phosphatidylcholine/cholesterol liposomes mediates high affinity high density lipoprotein binding and selective lipid uptake / B. Liu, M. Krieger // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, no. 37. – P. 34125–34135.
25. Recent advances of cell membrane-coated nanomaterials for biomedical applications / W.L. Liu, M.Z. Zou, S.Y. Qin, Y.J. Cheng, Y.H. Ma, Y.X. Sun // *Adv. Funct. Mater.* – 2020. – Vol. 30, no. 39. – P. 2003559.
26. Mabrey, S. Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry /

- S. Mabrey, J.M. Sturtevant // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1976 – Vol. 73. – P. 3862–3866.
27. Martín-Molina, A. Effect of calcium and magnesium on phosphatidylserine membranes: experiments and all-atomic simulations / A. Martín-Molina, C. Rodríguez-Beas, J. Farauto // Biophysical Journal. – 2012. – Vol. 102. – P. 2095–2103.
28. Calcium-lipid interactions observed with isotope-edited infrared spectroscopy / L.V. Mason, E.C. Alfredo, E. Ron, R.B. Carlos // Biophys. J. – 2020. – Vol. 118, no. 11. – P. 2694–2702.
29. Dendrimer, liposomes, carbon nanotubes and PLGA nanoparticles: one platform assessment of drug delivery potential / M. Nishi, K.T. Rakesh, K.M. Neelesh, C. Prashant, K.J. Narendra // American Association of Pharmaceutical Scientists. – 2014.
30. Glycerol-induced membrane stiffening: the role of viscous fluid adlayers / L. Pocivavsek, K. Gavrilov, K.D. Cao, E.Y. Chi, D. Li, B. Lin, M. Meron, J. Majewski, K.Y.C. Lee // Biophys. J. – 2011. – Vol. 101. – no. 1. – P. 118–127.
31. Liposomes: structure, biomedical applications, and stability parameters with emphasis on cholesterol / P. Nakhaei, R. Margiana, D.O. Bokov, W.K. Abdelbasset, M. Amin J. Kouhbanani., R.S. Varma, F. Marofi, M. Jarahian, N. Beheshtkhoo // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2021. – Vol. 9. – P. 705886.
32. Investigating the structure of multicomponent gel-phase lipid bilayers / R. Hartkamp, T.C. Moore, C.R. Iacovella, M.A. Thompson, P. Bulsara, D.J. Moore, C. McCabe // Biophysical Journal. – 2016. – Vol. 111, no. 4. – P. 813–823.
33. Salgado, A.J. Bone tissue engineering: state of the art and future trends / A.J. Salgado, O.P. Macromol Coutinho, R.L. Reis // Biosci. – 2004. – Vol. 4. – P. 743–765.
34. Ul-Islam A: Liposome as a carrier for advanced drug delivery / S.M. Shaheen, A.R. Shakil, M.N. Hossen, M. Ahmed, M.S. Amran // Pak. J. BiolSci. – 2006. – Vol. 9, no. 6. – P. 1181–1191.
35. Ca²⁺ channel nanodomains boost local Ca²⁺ amplitude / A.J. Salgado, R.W. Tsien, D.T. Yue // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – Vol. 110. – P. 15794–15799.
36. Structural changes in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer promoted by Ca (2+) ions: a small-angle neutron scattering study / D. Uhrikova, N. Kucerka, J. Teixeira, V. Gordeliy, P. Balgavy // Chemistry and Physics of Lipids. – 2008. – Vol. 155. – P. 80–89.
37. Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice / V. Fischer, M. Haffner–Luntzer, K. Prystaz, A. vom Scheidt, B. Busse, T. Schinke, M. Amling // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – P. 7223.
38. Vo, T.T.N. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration / T.T.N. Vo, F.K. Kasper, A.G.A. Mikos // Adv. Drug Deliv. – 2012. – Vol. 64. – P. 1292–1309.
39. Nanotechnology in bone tissue engineering. Nanomed. Nanotechnol / G.G. Walmsley, A. McArdle, R. Tevlin, A. Momeni, D. Atashroo, M.S. Hu, A.H. Feroze, V.W. Wong, P.H. Lorenz, M.T. Longaker // Biol. Med. – 2015. – Vol. 11. – P. 1253–1263.
40. Xin L. Formation strategies, mechanism of intracellular delivery and potential clinical applications of pH-sensitive liposomes / L. Xin, H. Guihua // Asian. Journal of Pharmaceutical Sciences, – 2013. – Vol. 8. – P. 319–328.
41. Role of phospholipids and copolymers in enhancing stability and controlling degradation of intravenous lipid emulsions / R. Yang, X. Zhang, F. Li, L. Ding // Colloid. Surf. A Physicochem. Eng. Asp. – 2013. – Vol. 436. – P. 434–442.

Финансирование Работа финансируется Грузинским научным фондом Шота Руставели в рамках фундаментального гранта FR-21-19898.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

THERMODYNAMIC AND SPECTROSCOPIC STUDY OF COMPLEX CALCIUM-CONTAINING LIPOSOMES

T.J. Mdzinarashvili^{1,2}, M.M. Khvedelidze^{1,2}, E.R. Shekiladze², S.V. Chinchaladze^{1,2}, M.T.Mdzinarashvili^{1,2}

¹ Faculty of Exact and Natural Sciences, I. Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia

² Institute of Medical and Applied Biophysics, I. Javakhishvili Tbilisi State University, Georgia

ARTICLE INFO

Received: 21 February 2024
Approved: 01 June 2024
Accepted for publication: 14 June 2024

Key words:

calorimetry, complex nanoparticles, liposomes, calcium

ABSTRACT

In the study, both uncomplexed and calcium-containing complex liposomes made of DPPA and DPPC phospholipids were studied calorimetrically and spectrophotometrically. Liposomes with a diameter of 200 nm were produced by new nanotechnology. As calcium molecules, CaCO₃ was used, which is used in medicine as a calcium supplement or antacid, which is used to relieve heartburn, stomach acidity. Complex liposomes were prepared in both water and 20% glycerol solvent. As calorimetric and spectrophotometric experiments show, CaCO₃ molecules made by new technology are incorporated into the structure of liposomes, which allows them to be used for treatment. In addition, calcium is placed in large quantities in such complex liposomes, although their entry into the blood does not cause side effects. The structure and thermal stability of complex liposomes were determined in the paper.

In particular, according to the obtained experimental results, we believe that the structure of calcium-containing nanoparticles can be both unilaminar and multilaminar, in particular, the structure of uncomplexed and calcium-containing DPPC liposomes prepared in water and glycerol are multilaminar. The structure of uncomplexed DPPA liposomes prepared in water is unilaminar, while calcium-containing DPPA liposomes prepared in water form a multilayer structure. As for the structure of both pure and calcium-containing DPPA liposomes prepared in glycerol are multilamellar. With some preliminary considerations, calcium-containing liposomes can be tested in experimental animals, and after obtaining positive results, they can be recommended for the treatment of hypocalcemia in humans.
