

Особенности формирования комплексов β -карбоксиметил циклодекстринов на поверхности липидных монослоёв

И. В. Григорян,^{1,2,*} А. М. Адельянов,¹ А. П. Пархаева,^{3,4} Г. Б. Хомутов,^{1,2}
Е. Ю. Симоненко,¹ А. Г. Миронова,⁵ В. А. Пигарева,⁶ А. В. Сыбачин^{6,†}

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

²Институт радиотехники и электроники имени В. А. Котельникова РАН
Россия, 125009, Москва, ул. Моховая, 11, стр. 7

³Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, факультет космических исследований
Россия, 119234, Москва, Ленинские Горы, д. 1, стр. 52

⁴Федеральный научно-клинический центр космической медицины Федерального медико-биологического агентства
Россия, 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 23, кор. 2

⁵Институт Биохимической Физики имени Н. М. Эмануэля РАН Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

⁶Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, химический факультет,
кафедра высокомолекулярных соединений
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

(Поступила в редакцию 17.05.2024; после доработки 20.05.2024; подписана в печать 03.06.2024)

В настоящей работе изучалось взаимодействие β -карбоксиметил циклодекстринов (КМЦД) с мономолекулярными слоями из смеси электронейтрального и катионного липидов на поверхности водной субфазы. Монослои переносились на подложки из слюды с помощью метода Ленгмюра–Блоджетт и исследовались методом атомно-силовой микроскопии. Анализ изотерм сжатия монослоев и АСМ-изображений показал, что адсорбция КМЦД на катионном ленгмюровском липидном монослое сопровождается формированием надмолекулярных ансамблей схожей морфологии вне зависимости от концентрации добавленных олигосахаридов.

PACS: 68.47.Re. УДК: 577.352.22

Ключевые слова: циклодекстрины, мономолекулярные липидные плёнки, липосомы, технология Ленгмюра–Блоджетт, доставка лекарств.

DOI: 10.55959/MSU0579-9392.79.2450701

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных задач современной биомедицины является доставка биологически активных соединений в целевые области с помощью наноконтейнеров, выполняющих защитные и транспортные функции [1–5]. Благодаря инкапсуляции гидрофобных биологически активных соединений в специальных коллоидных частицах и комплексах можно обеспечить их необходимое присутствие в кровотоке и соответствующее повышение терапевтической эффективности их применения. Такое использование наноконтейнеров представляет отдельный интерес в связи с тем, что применяемые в фармацевтике лекарственные препараты зачастую являются гидрофобными или малорастворимыми в водных средах [5–7].

В качестве наноконтейнеров для доставки биологически активных соединений могут быть использованы коллоидные системы различной природы — липосомы, полимерные мицеллы, наночастицы, в том числе магнитные [8–10], а также другие

носители [11–19]. Ключевыми требованиями, предъявляемыми исследователями к системам доставки, являются их биосовместимость, стабильность, биоразлагаемость и наличие большого полезного объёма для локализации инкапсулируемых веществ.

Перспективными наноконтейнерами для переноса водонерастворимых молекул в водной фазе являются циклодекстрины (ЦД) — циклические олигосахариды, образованные несколькими остатками D-глюкопиранозы [20]. Молекулы циклодекстринов представляют собой усечённые конусы с гидрофильной внешней поверхностью и гидрофобной полостью. Благодаря такой структуре они могут эффективно инкапсулировать гидрофобные соединения [21]. Образование комплексов подчиняется закону геометрического соответствия между размером внутренней полости ЦД и размером молекул-гостей [22].

Встречаются три типа циклодекстринов α , β и γ , которые различаются количеством остатков D-глюкопиранозы и, как следствие, размером внутренней полости. В биомедицине чаще всего применяются производные на основе β -ЦД с 7 остатками [23], причём на рынке уже представлено несколько препаратов на основе производных β -ЦД [24].

Одной из отличительных особенностей циклодекстринов является их высокая константа свя-

* E-mail: grigorian.iv19@physics.msu.ru

† E-mail: sybatchin@mail.ru

звания с липидными мембранами [25, 26], что в комплексе с отсутствием цитотоксичности [27, 28] даёт большие преимущества в использовании циклодекстринов для доставки биологически активных соединений.

Также отдельный интерес в изучении β -КМЦД представляет их способность переносить холестерин, что делает их перспективным компонентом криопротекторной среды для хранения биологического материала [29].

В нашей предыдущей работе было обнаружено, что электростатическая адсорбция β -КМЦД на поверхность катионных липосом приводит к формированию комплекса, в котором молекулы β -КМЦД формируют ансамбли на поверхности липидного бислоя. Таким образом реализуется возможность концентрирования множества гидрофобных молекул, инкапсулированных в β -КМЦД в малом объёме. При этом ёмкость такого наноконтейнера по гидрофобным молекулам значительно превышает ёмкость индивидуальных липосом, в которых липофильные молекулы встраиваются в бислои [27]. Тем не менее устройство таких ансамблей циклических олигосахаридов, а также особенность формирования ассоциатов на бислое детально не изучено. Данная информация представляет интерес для формирования высокоёмких наноконтейнеров для доставки гидрофобных биологически активных молекул.

В настоящей работе основное внимание уделено изучению адсорбции β -КМЦД на поверхности монослоёв из смеси электронейтрального и катионного липидов. Формирование комплексов и их морфология были исследованы комбинацией методов Ленгмюр–Блоджетт и атомно-силовой микроскопии (АСМ), широко применяемых для таких исследований [30].

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

β -Карбоксиметил циклодекстрин (β -КМЦД) со степенью замещения 3, согласно информации поставщика, был приобретен у Sigma-Aldrich (Missouri, USA). 1,2-Диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (ДОФХ), 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан хлорид (ДОТАП) были приобретены у Avanti Polar Lipids (Alabama, USA). Трис-буфер был приобретен у «Реахим» (Москва, Россия). Органические растворители — этанол, метанол, хлороформ были получены компанией «Компонент-Реактив» (Москва, Россия). Для приготовления растворов использовали деионизованную воду с электропроводностью 0.05 МКС/см.

Монослои были получены с помощью технологии Ленгмюра–Блоджетт на установке KSV NIMA KN 1002 (Espoo, Finland) с программным обеспечением, предоставленным производителем. В качестве объёмной фазы использовался буфер Трис с рН=7.0. Эксперименты проводили со смесью элек-

тронейтрального ДОФХ и катионного ДОТАП липидов, мольная доля ДОТАП составляла

$$\nu = \frac{[\text{ДОТАП}]}{[\text{ДОФХ}] + [\text{ДОТАП}]} = 0.3.$$

Нанесенные на твёрдую подложку липидные монослои изучались с помощью АСМ Bruker AxioVert компании Bruker (USA) в полуконтактном режиме. Использовались кантилеверы из поликремния с высокоточными составными зондами HA-FM фирмы TipsNano (Россия) с резонансной частотой 76 кГц и добротностью около 300. В качестве подложек для экспериментов по атомно-силовой микроскопии использовалась слюда [27].

Электрофоретическую подвижность (ЭФП) комплексов циклодекстринов контролировали с помощью оборудования Brookhaven ZetaPlus (Brookhaven, USA) с программным обеспечением, предоставленным производителем. Гидродинамические диаметры измерялись методом динамического рассеяния света (DLS) с использованием оборудования Brookhaven ZetaPlus (Brookhaven, USA) с программным обеспечением, предоставленным производителем. Измерения электропроводности проводились с помощью кондуктометра SevenCompact (Mettler-Toledo, Switzerland).

Все эксперименты проводились при комнатной температуре. Результаты по меньшей мере пяти экспериментов представлены в виде усреднённых значений.

2. ЭКСПЕРИМЕНТЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ

Адсорбция β -КМЦД на поверхность ДОТАП/ДОФХ-липосом имеет электростатическую природу. На рис. 1 представлены результаты титрования суспензии липосом с $\nu = 0.3$ в виде зависимостей ЭФП (рис. 1, кривая 1) и электропроводности (рис. 1, кривая 2) системы от концентрации добавленных КМЦД. Видно, что добавление отрицательно заряженных олигосахаридов приводит к уменьшению значений ЭФП за счёт нейтрализации поверхностного заряда липосом карбоксильными группами КМЦД и возрастанию электропроводности системы за счёт высвобождения противоионов ДОТАП и КМЦД; Cl^- и Na^+ соответственно. Формирование насыщенного комплекса приводит к выходу концентрационной зависимости ЭФП на плато, а также к формированию линейного участка на концентрационной зависимости электропроводности, которая обусловлена изменением проводимости суспензии только за счёт новых порций добавленных КМЦД. Рассчитанный состав насыщенного комплекса составляет от 3 до 6 молекул КМЦД на одну молекулу ДОТАП в липосомальной мембране.

Таким образом, число адсорбированных молекул КМЦД на поверхности липидного бислоя в насыщенном комплексе значительно превышает как количество липидов на внешнем монослое, так и чис-

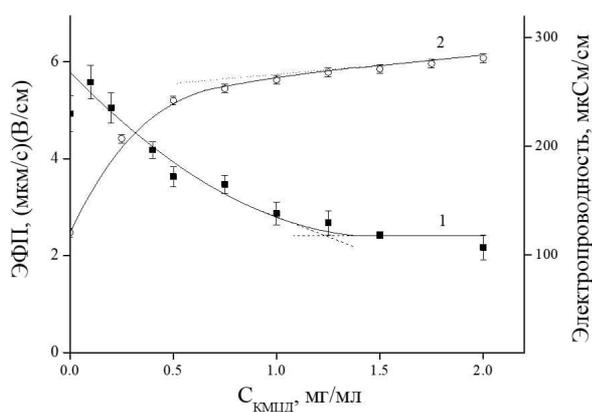


Рис. 1. Кривые титрования суспензии липосом с $\nu = 0.3$ в виде зависимостей ЭФП (кривая 1) и электропроводности КМЦД (кривая 2) системы от концентрации добавленных КМЦД

ло молекул КМЦД, достаточных для полного заполнения поверхности липосомы монослоем циклических олигосахаридов. Иными словами, на поверхности бислоя формируются многоуровневые ассоциаты, сформированные несколькими молекулами КМЦД. Возникает вопрос, каким образом происходит формирование таких ансамблей при добавлении КМЦД к липосомам — путём «последнего» заполнения поверхности комплекса или же надмолекулярные структуры формируются независимо, а с ростом концентрации добавленного в систему КМЦД увеличивается лишь доля таких ассоциатов на поверхности. Поэтому для более детального изучения взаимодействия КМЦД с липидными системами было проведено исследование взаимодействия КМЦД с монослоем из смеси ДОФХ/ДОТАП с $\nu = 0.3$.

Мономолекулярные слои липидов на поверхности водной субфазы были получены с помощью технологии Ленгмюра–Блоджетт. Для изучения адсорбции β -карбоксиметил циклодекстринов на монослоях были изучены изотермы сжатия монослоёв вышеуказанных монослоев при добавлении КМЦД в соотношениях между числом молекул КМЦД в водной фазе и числом липидов 1:3, 1:1, 3:1. Анализ кривых титрования липосом показал, что образование устойчивой системы наблюдается при соотношении между числом молекул КМЦД в водной фазе и числом липидов 1:1. В результате представляет интерес изучить взаимодействия КМЦД с монослоями при данном соотношении, а также в соотношениях 1:3 и 3:1, чтобы детальнее изучить механизм адсорбции. Полученные π - A изотермы сжатия представлены на рис. 2.

Анализируя изотерму сжатия монослоя без добавки КМЦД («Липиды»), можно сделать вывод, что поверхностное давление начинает расти, когда монослой поджат до площади $A = 2.3 \text{ нм}^2$ на мо-

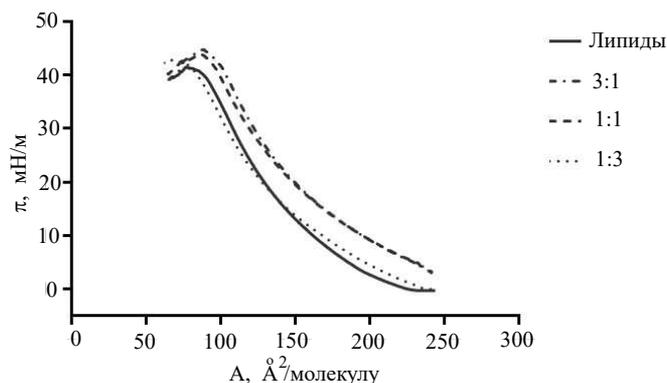


Рис. 2. Изотермы сжатия монослоя ДОФХ/ДОТАП с добавкой КМЦД 1 к 3 по числу молекул; ДОФХ/ДОТАП с добавкой КМЦД 1 к 1 по числу молекул; ДОФХ/ДОТАП с добавкой КМЦД 1 к 6 по числу молекул; ДОФХ/ДОТАП с добавкой КМЦД 1 к 6 по числу молекул

лекулу липида в монослое и достигает $20 \frac{\text{мН}}{\text{М}^2}$ — характерного значения поверхностного давления, при котором монослой можно считать сформированным [31], то есть при $A = 1.3 \text{ нм}^2$ на молекулу. После добавления к липидному монослою молекул β -карбоксиметилциклодекстринов в соотношении 1:3 меняется кривизна изотермы сжатия, что свидетельствует об изменении жёсткости монослоя, а значит, и о частичной адсорбции молекул КМЦД на монослое [31], приводящей к изменению механических свойств монослоя.

Для мольных соотношений КМЦД/ДОТАП 1:1 и 3:1 поверхностное давление начинает расти, когда монослой поджат до площади $A = 2.5 \text{ нм}^2$ на молекулу и достигает $20 \frac{\text{мН}}{\text{М}^2}$ при $A = 1.5 \text{ нм}^2$ на молекулу. Такой сдвиг $\pi - A$ изотерм свидетельствует об изменении количества молекул на поверхности водной фазы, то есть о появлении дополнительных молекул на границе раздела фаз, уменьшающих поверхностное натяжение согласно уравнению адсорбции Гиббса [31]. В результате анализ изотерм поверхностного давления позволяет сделать вывод о росте адсорбции молекул β -карбоксиметил циклодекстринов на поверхности монослоя при увеличении концентрации КМЦД в водной фазе.

Для более детального изучения взаимодействия β -карбоксиметил циклодекстринов с монослоем был применён метод атомно-силовой микроскопии. Липидные монослои с адсорбированными молекулами β -карбоксиметил циклодекстринов переносились на твёрдую слюдяную подложку согласно общепринятой методике Ленгмюра–Блоджетт [28]: твёрдая подложка слюды медленно опускалась и поднималась сквозь поверхность монослоя, при этом поверхностное давление монослоя поддерживалось постоянным с помощью подвижного барьера и специального автоматизированного следящего устройства. В начале было получено изображение монослоя без добавки КМЦД. Видно, что тол-

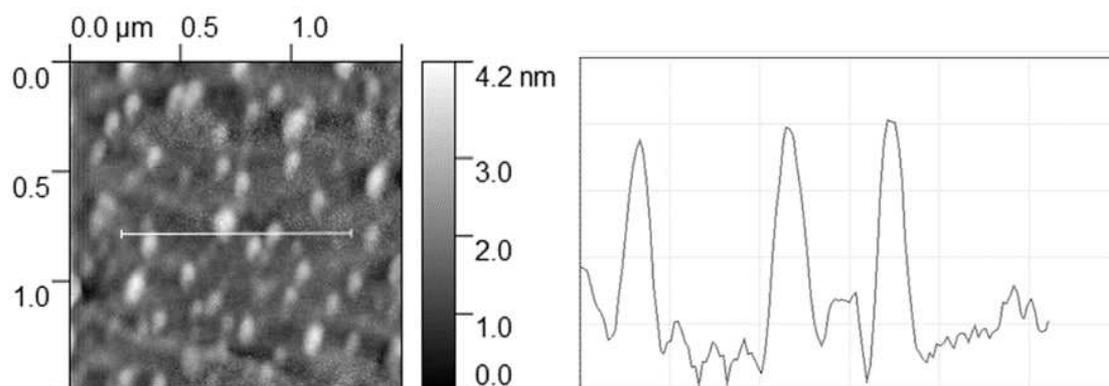


Рис. 3. АСМ-изображение монослоя с добавленными молекулами КМЦД в соотношении 3 к 1 по числу молекул

щина монослоя достигает 2 нм, а поверхность является достаточно однородной. Важно отметить, что в некоторых участках подложки из-за особенностей метода нанесения возможно образование бислоя толщиной до 4 нм, что не оказывает существенного влияния на проведение эксперимента.

При соотношении 1:3 на поверхности монослоя чётко видны области с адсорбированными молекулами КМЦД, выступающими над поверхностью монослоя на высоту до 2 нм и имеющими ширину от 200 нм до 800 нм. Учитывая, что размеры отдельных молекул КМЦД имеют порядка 0.7 нм [27], можно говорить о формировании надмолекулярных агрегатов и комплексов адсорбированными молекулами β -карбоксиметил циклодекстринов даже при их малых концентрациях в водной фазе.

При соотношении 1:1 (рис. 3), т.е. при повышении концентрации молекул КМЦД в водной фазе отчётливо видно, что количество областей с адсорбированными молекулами КМЦД увеличивается, причём характерные размеры этих областей сохраняются. Эти данные свидетельствуют об увеличении адсорбции β -карбоксиметилциклодекстринов на липидном монослое и о сохранении тенденции к образованию надмолекулярных структур адсорбированными молекулами, что также подтверждается характером изотерм сжатия. Для соотношения 3:1 данные аналогичны.

Эффективная адсорбция β -карбоксиметил циклодекстринов на границе раздела фаз обусловлена электростатическим взаимодействием отрицательно заряженных олигосахаридов с катионной поверхностью монослоя. Эти данные также подтверждаются экспериментами на липосомах, сформированных из той же липидной фазы [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы был изучен характер взаимодействия β -карбоксиметил циклодекстринов с моносло-

ем из смеси электронейтрального (ДОФХ) и катионного (ДОТАП) липида. Монослои были получены с помощью технологии Ленгмюра–Блоджетт и исследованы методом атомно-силовой микроскопии. Анализ АСМ-изображений поверхности монослоя с адсорбированными молекулами КМЦД подтвердил выводы, сделанные на основе анализа изотерм сжатия, и позволил сделать предположение о формировании надмолекулярных структур — агрегатов адсорбированными молекулами β -карбоксиметил циклодекстринов.

В результате работы были получены данные по адсорбции молекул КМЦД на липидном монослое из смеси катионного и электронейтрального липидов. Установлено, что при адсорбции молекулы КМЦД образуют надмолекулярные ассоциаты — стопки, молекулы олигосахаридов в которых расположены друг над другом. Обнаружено, что формирование таких ассоциатов в процессе адсорбции происходит не последовательным поуровневым заполнением стопок, а путём заполнения поверхности монослоя ассоциатами сходного состава.

Данные результаты имеют большой интерес с точки зрения дальнейшего изучения возможности применения β -карбоксиметил циклодекстринов в качестве систем для направленной доставки биологически активных соединений.

Исследования проводились в рамках Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ «Космос», проект «Повышение эффективности криоконсервации биологического материала для длительного хранения и транспортировки на дальние расстояния, в том числе в условиях космоса».

Молодой ученый Илья Григорян является стипендиатом Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС».

- [1] Zorkina Y., Abramova O., Ushakova V. et al. // *Molecules* **25**. 5294. (2020).
- [2] Chali S. P., Ravoo B. J. et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**. 2962. (2020).
- [3] Kashapov R., Ibragimova A., Pavlov R. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* **22**. 7055. (2021).
- [4] Nechaeva A., Artyukhov A., Luss A. et al. // *Polymers* **14**. 1727. (2022).
- [5] Ladurantie C., Coustets M., Czaplicki G. et al. // *Nanoscale*. **11**. 3248 (2019).
- [6] Larrañeta E, Stewart S, Ervine M et al. // *J. Funct. Biomater.* Jan 24;9(1):13. (2018).
- [7] Kang B., Okwieka P., Schöttler S. et al. // *Biomaterials*. **49**. 125 (2015).
- [8] Gorbunova E.A., Stepanova D.A., Kosov A.D. et al. // *J. Photochem. Photobiol.* **426**. 113 (2022).
- [9] Prilepskii A., Schekina A., Vinogradov V. et al. // *Nanotechnol. Sci. Appl.* **12**. 11. (2019).
- [10] Zashikhina N.N., Volokitina M.V., Korzhikov-Vlakh V.A. et al. // *Eur. J. Pharm. Sci.* **109**. 1 (2017).
- [11] Stepanova D.A., Pigareva V.A., Berkovich A.K. et al. // *Polymers* **14**. 4013. (2022).
- [12] Zhang K., Liu J., Guo Y. et al. // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **87**. 1. (2018).
- [13] Yetisgin A.A., Cetinel S., Zwin M. et al. // *Molecules* **25**. 2193. (2020).
- [14] Mikušová V., Mikuš P. // *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9652 (2021).
- [15] Alavi M., Hamidi M. // *Drug Metab. Pers. Ther.* **34**. 1. (2019).
- [16] Chen Y., Lu Y., Lee R.J., Xiang G. // *Int. J. Nanomed.* **15**. 3099 (2020).
- [17] Patel S.S., Acharya A., Ray R.S. et al. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **60**. 887 (2020).
- [18] Laomeephol C., Ferreira H., Kanokpanont S. et al. // *Int. J. Pharm.* **589**. 119844. (2020).
- [19] Koksharov Yu.A., Gubin S.P., Taranov I.V. et al. // *Journal of Communications Technology and Electronics*. **67**, N 2. (2022).
- [20] Loftsson T. // *J. Pharm. Sci.* **110**. 654 (2021).
- [21] Crini G., Fourmentin S., Fenyvesi E. et al. // *Environ. Chem. Lett.* **16**. 1361 (2018).
- [22] Saokham P., Muankaew C., Jansook P., Loftsson T. // *Molecules*. **23**. 1161. (2018).
- [23] Gadade D.D., Pekamwar S.S. // *Adv. Pharm. Bull.* **10**. 166 (2020).
- [24] Pawar S., Shende P., Trotta F. // *Int. J. Pharm.* **565**. 333 (2019).
- [25] Hammoud Z., Khreich N., Auezova L. et al. // *Int. J. Pharm.* **564**. 59 (2019).
- [26] Skuredina A.A., Tychinina A.S., Le-Deygen I.M. et al. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* **46**. 692 (2020).
- [27] Sybachin A., Pigareva V. // *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* **1867**(6). 130363 (2023).
- [28] Pravin Shende, Yogesh A. Kulkarni, Gaud R.S. et al. // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **104**(5). 1856 (2015).
- [29] Ivanova A., Simonenko E., Yakovenko S., Spiridonov V. // *Biophys Rev.* **15**(5). 1223 (2023).
- [30] Sarah Hagedorn, Elizabeth Drolle, Holly Lorentz et al. // *J Optom.* **8**(3). 187 (2015).
- [31] Yaroslavov A.A., Sitnikova T.A., Rakhnyanskaya A.A. et al. // *Colloid Polym Sci.* **295**. 1405 (2017).

Features of the Formation of Complexes of β -Carboxymethyl Cyclodextrins on the Surface of Lipid Monolayers

I. V. Grigoryan^{1,4,a}, A. M. Adelyanov¹, G. B. Khomutov^{1,4}, A. P. Parkhaeva^{3,6}, E. Y. Simonenko¹, A. G. Mironova⁵, V. A. Pigareva², A. V. Sybachin^{2,b}

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Department of Biophysics. Moscow, 119991, Russia

²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of High Molecular Weight Compounds. Moscow, 119991, Russia

³Lomonosov Moscow State University, Faculty of Space Research Moscow, 119991, Russia

⁴V. A. Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics of the Russian Academy of Sciences Moscow, 125009, Russia

⁵N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences Moscow, 119334, Russia

⁶Federal Scientific and Clinical Center for Space Medicine of the Federal Medical and Biological Agency Moscow, 123098, Russia

E-mail: ^agrigorian.iv19@physics.msu.ru, ^bsybatchin@mail.ru

In this study, the interaction of β -carboxymethyl cyclodextrins (CMCD) with monomolecular layers composed of a mixture of electroneutral and cationic lipids on the surface of an aqueous subphase was investigated. The monolayers were transferred onto mica substrates using the Langmuir–Blodgett method and examined by atomic force microscopy. Analysis of the monolayer compression isotherms and AFM images showed that the adsorption of CMCD on the cationic Langmuir lipid monolayer is accompanied by the formation of supramolecular ensembles of similar morphology regardless of the concentration of the added oligosaccharides.

PACS: 68.47.Pe.

Keywords: cyclodextrins, monolayers, liposomes, Langmuir–Blodgett technology, drug delivery.

Received 17 May 2024.

English version: *Moscow University Physics Bulletin*. 2024. **79**, No. 5. Pp. .

Сведения об авторах

1. Григорян Илья Валентинович — сотрудник кафедры биофизики физического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова, сотрудник ИРЭ им. В. А. Котельникова РАН; e-mail: grigorian.iv19@physics.msu.ru.
2. Пархаева Анна Павловна — мл.науч.сотрудник ФНКЦ КМ ФМБА, студент магистратуры ФКИ МГУ; e-mail: athinktoo@gmail.com.
3. Адельянов Артём Маратович — вед. программист; e-mail: adelyanov@physics.msu.ru.
4. Симоненко Екатерина Юрьевна — канд. физ.-мат. наук, доцент, e-mail: ksimonenko@inbox.ru.
5. Миронова Анна Геннадьевна — сотрудник ИБХФ РАН, e-mail: agm90@mail.ru.
6. Хомутов Геннадий Борисович — доктор физ.-мат. наук, профессор, e-mail: gbk@mail.ru.
7. Пигарева Владислава Алексеевна — мл. науч. сотрудник, e-mail: vladislava@mail.ru.
8. Сыбачин Андрей Владимирович — канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, доцент; e-mail: sybatchin@mail.ru.