ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ ХИМИИ, 2023, том 93, № 6, с. 931–943

УДК 544.344.3

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСА ДОКСОРУБИЦИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ И ВИОЛОГЕНОВОГО КАЛИКС[4] РЕЗОРЦИНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОСТИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

© 2023 г. Р. Р. Кашапов[1,*], Ю. С. Разуваева[1], А. Ю. Зиганшина[1], А. С. Сапунова[1], А. Д. Волошина[1], В. В. Сальников[2], Л. Я. Захарова[1]

[1] Институт органической и физической химии имени А. Е. Арбузова, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», ул. Академика Арбузова 8, Казань, 420088 Россия
[2] Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, 420111 Россия
**e-mail: kashapov@iopc.ru*

Поступило в редакцию 18 апреля 2023 г.
После доработки 20 апреля 2023 г.
Принято к печати 21 апреля 2023 г.

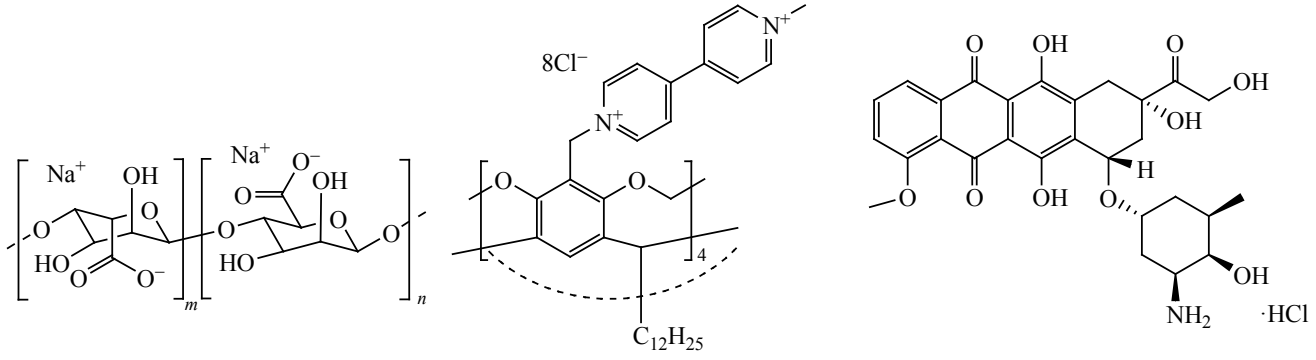
Получена биосовместимая супрамолекулярная система на основе альгината натрия и виологенового каликс[4]резорцина для инкапсуляции гидрохлорида доксорубицина (DOX). Совокупностью физико-химических методов найдено соотношение полимер:макроцикл, при котором формируются стабильные наночастицы, и определены их морфологические характеристики. Показано, что с увеличением концентрации каликс[4]резорцина происходит увеличение размера и изменение дзета-потенциала наночастиц от отрицательных к положительным значениям. Установлено, что наиболее оптимальной супрамолекулярной системой для связывания DOX является композиция с соотношением макроцикл:полимер = 1:50, причем изменение соотношения компонентов может инициировать высвобождение лекарства. Показано влияние инкапсулированного DOX на физико-химические и биологические свойства супрамолекулярной системы.

Ключевые слова: каликсарен, самосборка, комплексообразование, инкапсулирование, цитотоксичность, агрегация

DOI: 10.31857/S0044460X23060124, **EDN:** FMJYQY

Супрамолекулярная самосборка амфифильных строительных блоков является перспективным подходом для создания функциональных коллоидных систем [1–3]. С помощью данного подхода можно получать наночастицы без трудоемкого органического синтеза, без использования органических растворителей, температурного и ультразвукового воздействия. Наглядным примером таких разработок является создание супрамолекулярных амфифилов или супраамфифилов – нековалентных комплексов между гидрофильными и гидрофобными компонентами [4–7]. Супраамфифильные системы привлекают огромное внимание благодаря возможности формирования различных коллоидных наноструктур посредством спонтанной самоорганизации гидрофильных и гидрофобных молекул. Кроме того, нековалентная природа супрамолекулярных взаимодействий в этих си-

Схема 1.



Alg VR DOX

стемах обеспечивает их эффективный отклик на различные внешние воздействия. Эти уникальные характеристики позволяют рассматривать супраамфифилы в качестве перспективных систем с настраиваемыми свойствами для инкапсуляции биологически активных соединений.

В создании супраамфифилов могут быть использованы различные каликсарены с жесткой макроциклической матрицей и гибкие линейные молекулы. Например, стимул-чувствительные везикулярные наночастицы могут быть получены путем электростатического взаимодействия сульфонатного каликс[4]арена с хитозаном [8] и протамином [9]. В работе с полипептидом было показано, что формируемые везикулы являются нетоксичными и могут расщепляться под действием фермента трипсина с контролируемым высвобождением инкапсулированных гидрофильных лекарств [9]. В другой работе [10] было продемонстрировано, что в смешанной системе хитозана с сульфонатным каликс[8]ареном обеспечивается дополнительное связывание с алкалоидными молекулами благодаря лабильности большой ароматической полости. Таким образом, этот макроцикл может заменить часто используемый триполифосфатный сшивающий агент с дополнительным преимуществом образования комплексов включения с биоактивными молекулами. Подобные закономерности совместной агрегации и инкапсуляции алкалоидов были выявлены при исследовании взаимодействия различных сульфонатных каликсаренов и молекул декстрана с метилимидазольными группами [11], причем более гибкая структура декстрана позволяет получать агрегаты меньшего размера, чем на основе хитозана.

Как видно из представленного выше анализа небольшого количества работ, при формировании супрамолекулярных систем на основе каликсаренов и полимеров были использованы анионные макроциклы и катионные полимеры. В данной работе в качестве макроциклического амфифила был выбран катионный каликс[4]резорцин, модифицированный виологеновыми фрагментами по верхнему ободу и н-додецильными группами по нижнему ободу (VR, схема 1). Выбор такого макроцикла обусловлен тем, что его алкильные фрагменты могут взаимодействовать с гидрофобными областями полимерной цепи посредством нековалентной связи [12], а наличие виологеновых групп обеспечивает высокую водную растворимость ароматического каркаса с четырьмя достаточно длинными алкильными группами. Кроме придания водной растворимости, являющейся ключевым моментом биосовместимости, электронно-дефицитная природа виологеновых групп может быть ответственна за такие супрамолекулярные взаимодействия, как π–π-стекинг, катион–π и электростатическое взаимодействие [13], которые кооперативно, в комбинации с гидрофобным эффектом, могут участвовать в формировании стабильной супрамолекулярной системы. В качестве полимерного компонента композиции был использован альгинат натрия (Alg, схема 1), являющийся полезным компонентом многих пищевых и биомедицинских

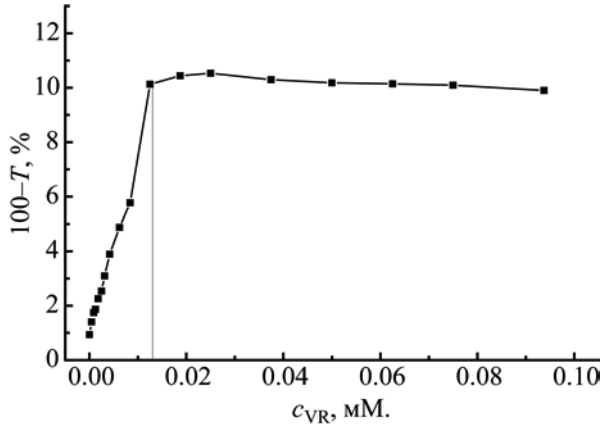


Рис. 1. Зависимость мутности смешанной системы 0.1 мМ. Alg–VR при 450 нм от концентрации VR в водной среде при 25°C.

систем [14]. Полученные агрегаты на основе VR и Alg были исследованы в качестве наноконтейнера для противоопухолевого препарата гидрохлорида доксорубицина (DOX, схема 1).

На первом этапе изучения смешанной агрегации VR и Alg был использован метод турбидиметрии, показывающий изменение мутности раствора в зависимости от соотношения компонентов. Процесс комплексообразования противоположно заряженных компонентов и формирования агрегатов, приводящий к повышению мутности раствора, контролировали, измеряя светорассеяние на абсорбционном спектрофотометре. Метод турбидиметрического титрования показал, что добавление компонента VR к Alg приводит к резкому возрастанию мутности до достижения соотношения VR:Alg = 1:8 (рис. 1). При дальнейшем увеличении доли VR эти агрегаты не разрушаются и мутность не снижается, что отражается на отсутствии снижения оптической плотности после достижения восьмикратного избытка полимера. Таким образом, одна молекула VR способна связывать полимер Alg, ориентируя вокруг себя восемь мономерных звеньев Alg, что свидетельствует об электростатическом механизме взаимодействия между VR и Alg.

На концентрационной зависимости удельной электропроводности в водных растворах 0.1 мМ. Alg–VR наблюдаются два перегиба (рис. 2а), первый из которых соответствует соотношению VR:Alg = 1:8, а второй – при концентрации VR 0.05 мМ., что соответствует соотношению VR:Alg = 1:2. Первоначальное отсутствие изменений значений удельной электропроводности в этих смешанных растворах до достижения первого перегиба указывает на электростатическую компенсацию избытка положительных зарядов VR отрицательно заряженными группами Alg. Вероятно, первый перегиб при соотношении VR:Alg = 1:8 соответствует полной компенсации положительных зарядов VR и отрицательных зарядов Alg, ответственной за формирование смешанных агрега-

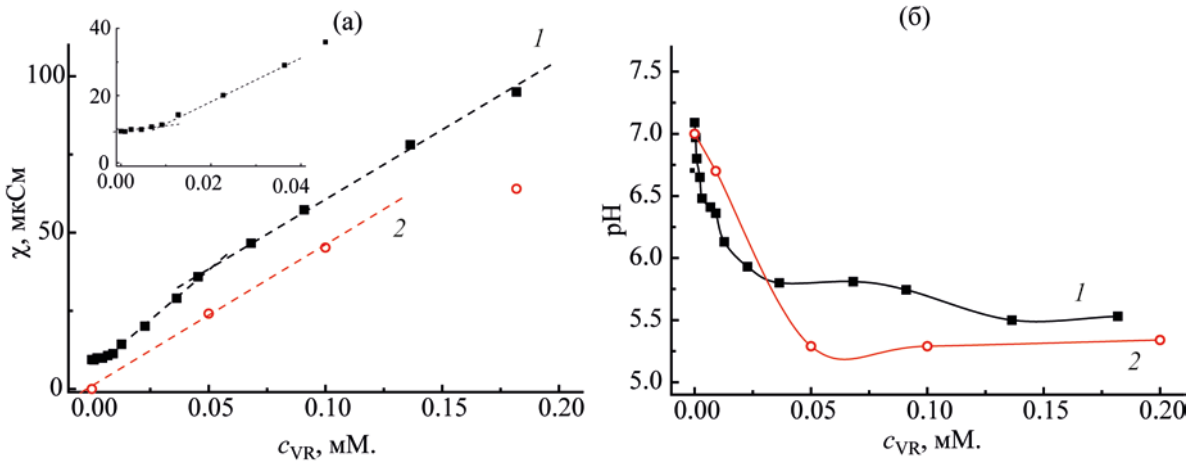


Рис. 2. Зависимость удельной электропроводности (а) и pH (б) в индивидуальном растворе VR (*1*) и смешанной системе 0.1 мМ Alg–VR (*2*) от концентрации VR в водной среде при 25°C.

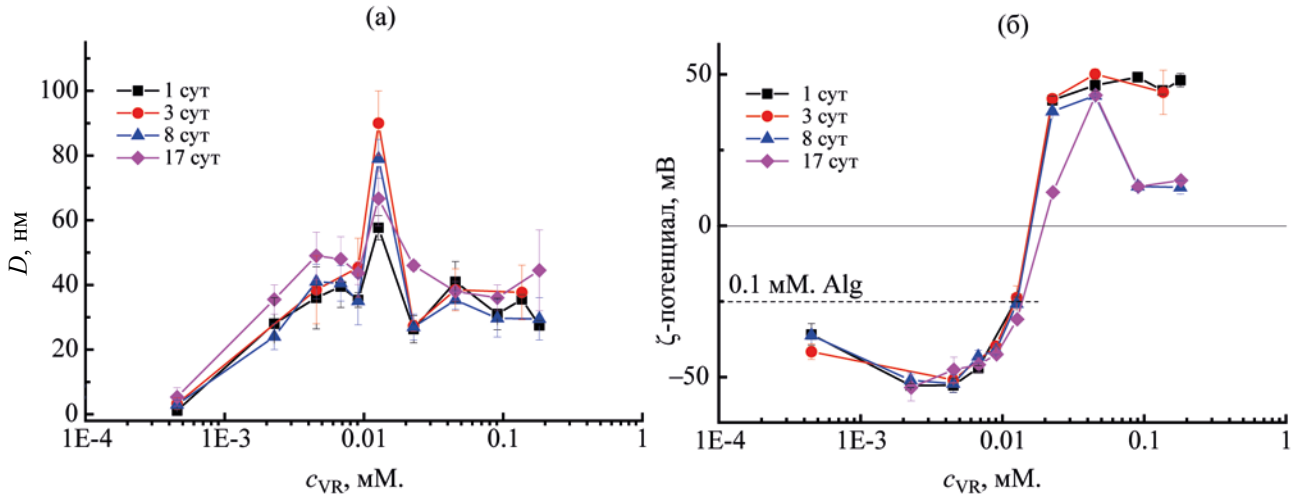


Рис. 3. Зависимость гидродинамического диаметра (а) и дзета-потенциала (б) частиц, формируемых в смешанном растворе 0.1 мМ. Alg–VR, от концентрации VR в водной среде при 25°C.

тов, а при соотношении VR:Alg = 1:2 образование этих агрегатов за счет электростатического притяжения прекращается. Аналогичные перегибы наблюдаются на зависимости изменения pH в смеси 0.1 мМ. Alg–VR от концентрации VR. В водных индивидуальных растворах VR наблюдается снижение pH, вследствие ионизации воды в сольватных оболочках положительно заряженных атомов азота [15]. Поэтому добавление его к нейтральному раствору Alg приводит к снижению pH (рис. 2б).

Для исследования морфологических характеристик супрамолекулярных структур, образованных в процессе совместной агрегации Alg и VR, образцы были исследованы с помощью динамического рассеяния света (ДРС) (рис. 3а, S1, см. Дополнительные материалы). В растворах с постоянной концентрацией Alg 0.1 мМ. наночастицы начали образовываться при 50-кратном молярном недостатке VR. В целом, ход зависимости изменения размеров смешанных агрегатов от концентрации VR соотносится с данными турбидиметрии, поскольку максимальное значение размеров агрегатов наблюдается при восьмикратном избытке полимера, а при соотношении VR:Alg = 1:9 происходит перезарядка наночастиц: смена отрицательного дзета-потенциала на положительный. Интересно отметить, что добавление первых порций макроцикла к раствору полимера вместо компенсации заряда приводит, наоборот, к увеличению его отрицательного дзета-потенциала (рис. 3б). Вероятной причиной такого более отрицательного значения дзета-потенциала в присутствии небольшой доли положительно заряженного VR является адсорбция части гидроксид-ионов на поверхности частиц вблизи молекул макроциклов. Как отмечено выше, в водной системе VR–Alg может происходить достаточно сильная поляризация молекул воды как заряженными виологеновыми фрагментами макроцикла, так высвобождающимися при связывании Alg хлорид-противоионами, вплоть до их ионизации в сольватных оболочках. В результате взаимодействия диполей воды с положительным зарядом VR и хлорид-ионами образуются гидроксид-ионы и сопряженные ионы гидроксония. В силу своего меньшего размера по сравнению с хлорид-противоионами и высокой плотности заряда гидроксид-ионы могут связываться с виологеновыми группами макроцикла, что обусловливает более отрицательное значение дзета-потенциала при добавлении VR к Alg.

Надо отметить, что в смешанных системах с фиксированным количеством Alg (0.1 мМ.) наблюдался небольшой разброс значений гидродинамического диаметра в течение 17 дней хранения при комнатной температуре (рис. 3а), а значительные изменения дзета-потенциала наблюдались только

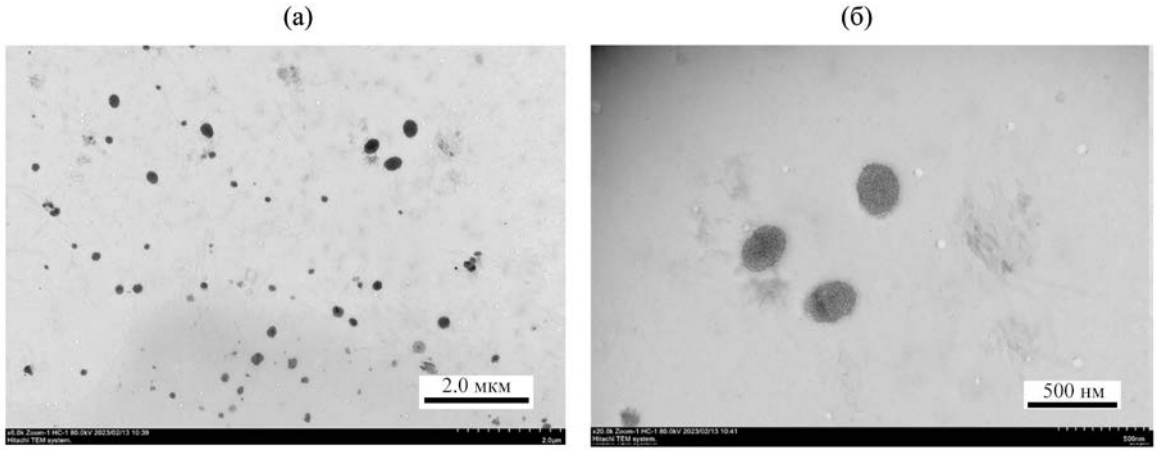


Рис. 4. Изображения ПЭМ для агрегатов, образованных в смешанной системе VR–Alg (1:50) с масштабом 2.0 мкм (а) и 500 нм (б).

в растворах с большим избытком VR. Таким образом, наиболее стабильные наночастицы формируются при избытке Alg. Предполагаемой причиной того, что наибольшая стабильность наблюдается при избытке полимера, а не макроцикла, возможно, является различие в конформационной подвижности смешиваемых компонентов. Молекула VR имеет конформационно жесткий остов из-за двух типов мостиков (диоксиметиленовых мостиков на верхнем ободе и метиленовых мостиков на нижнем ободе), не позволяющим ароматическую каркасу изгибаться при взаимодействии с полимером. Линейная структура Alg обусловливает лабильность полимера, позволяющую быстрее самоорганизоваться в присутствии небольшого количества противоположно заряженного макроцикла. Следовательно, устойчивость образуемых наночастиц на основе VR и Alg определяется конформационной гибкостью полимера, способствующей более быстрому образованию смешанных агрегатов.

Убедившись с помощью ДРС в том, что добавление VR в водный раствор Alg приводит к формированию смешанных агрегатов, для смеси VR–Alg (1:50) были получены микрофотографии с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). На рис. 4 видно наличие сферических агрегатов, достаточно равномерно распределенных по поверхности медной сетки с распределением частиц по размерам от 100 до 360 нм, что соотносится с результатами ДРС. Отсутствие частиц диаметром меньше 100 нм, которые наблюдали методом ДРС для раствора VR–Alg (1:50), обусловлено концентрированием образца при его пробоподготовке. Данное предположение было подтверждено экспериментально с помощью ДРС, согласно которому при увеличении общей концентрации системы в смешанном растворе формируются более крупные агрегаты с более высокой полидисперсностью (рис. S2, см. Дополнительные материалы).

Известно, что DOX взаимодействует с Alg по электростатическому механизму [16, 17], что сопровождается снижением его флуоресценции. Интенсивность флуоресценции DOX достаточно резко снижается при эквимолярном соотношении Alg–DOX, однако избыток Alg еще сильнее снижает флуоресценцию (рис. 5). Поскольку взаимодействие Alg и с VR, и с DOX идет по одному и тому же электростатическому механизму, VR и DOX будут конкурировать друг с другом за связывание с полимером. В связи с этим для определения состава тройных композиций система, содержащая 0.1 мМ. Alg и 0.02 мМ. DOX, была оттитрована раствором макроцикла. Добавление первых порций VR к системе Alg–DOX не влияет на интенсивность флуоресценции DOX, что означает отсутствие вытеснения DOX из комплекса (рис. 6), но при концентрации VR свыше 2 мкМ. интенсивность флуоресценции DOX начинает по-

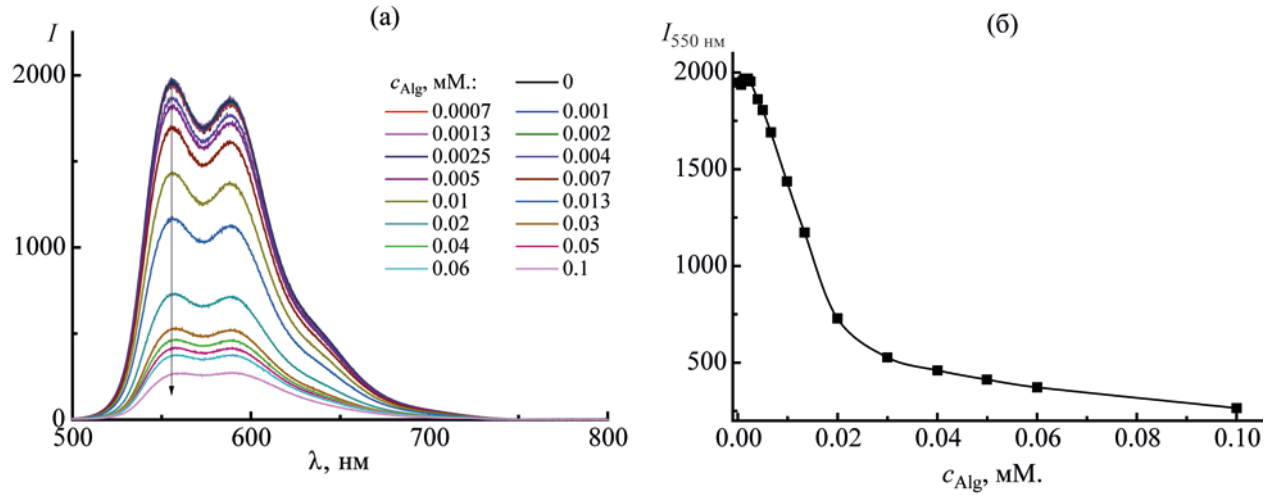


Рис. 5. Спектры флуоресценции DOX (*c* 0.02 мМ.) в присутствии различной доли Alg в водной среде при 25°C (а); зависимость интенсивности флуоресценции DOX при 550 нм от концентрации Alg (б).

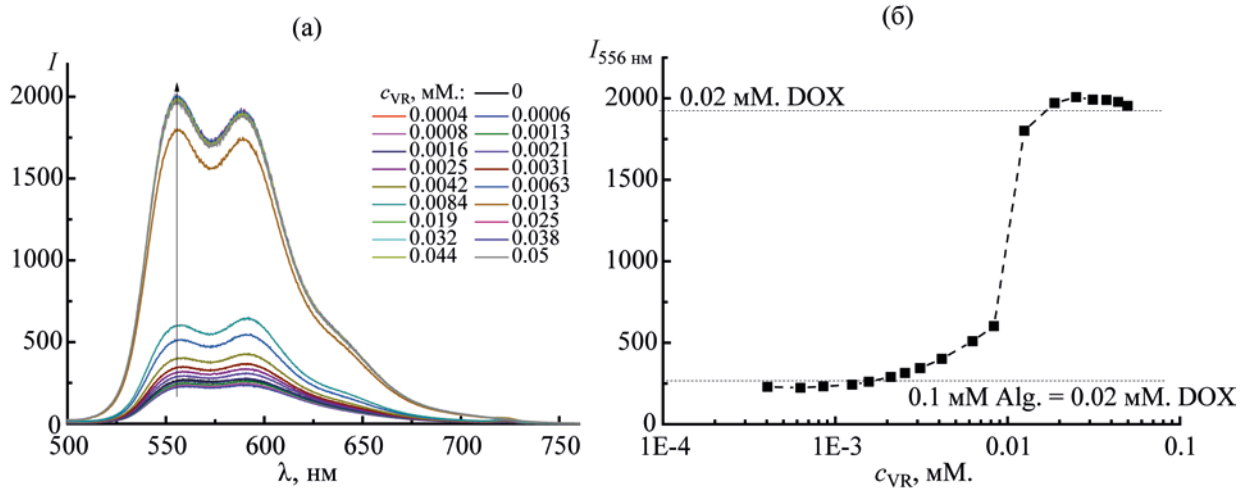


Рис. 6. Спектры флуоресценции DOX (с 0.02 мМ.) в присутствии смешанных растворов с постоянной концентрацией 0.1 мМ. Alg и различного количества VR (а) и зависимость интенсивности флуоресценции DOX при 555 нм в смешанных растворах с постоянной концентрацией 0.1 мМ. Alg от концентрации VR в водной среде при 25°C (б).

степенно возрастать, что говорит о высвобождении лекарства. Резкое повышение флуоресценции наблюдается при соотношении VR:Alg = 1:8, соответствующему полной нейтрализации отрицательных зарядов мономерного звена полимера положительным зарядами макроцикла. Следовательно, для связывания DOX наиболее оптимальной супрамолекулярной системой является композиция с соотношением компонентов VR:Alg = 1:50. Такое количество VR по отношению к Alg достаточно для формирования смешанных агрегатов (рис. 3), и при этом макроцикл еще не вытесняет DOX из комплекса с полимером. Интересно отметить, что добавление DOX к системе VR–Alg (1:50) приводит к небольшому возрастанию размеров частиц с 30 до 38 нм и значительному улучшению корреляционной функции. В течение двух недель в растворе VR–Alg–DOX постепенно возрастает полидисперсность, а средний диаметр агрегатов увеличивается до 50 нм (рис. S3, см. Дополнительные материалы).

Для дальнейших экспериментов по высвобождению DOX была исследована композиция, содержащая 0.1 мМ. Alg, 0.002 мМ. VR и 0.02 мМ.

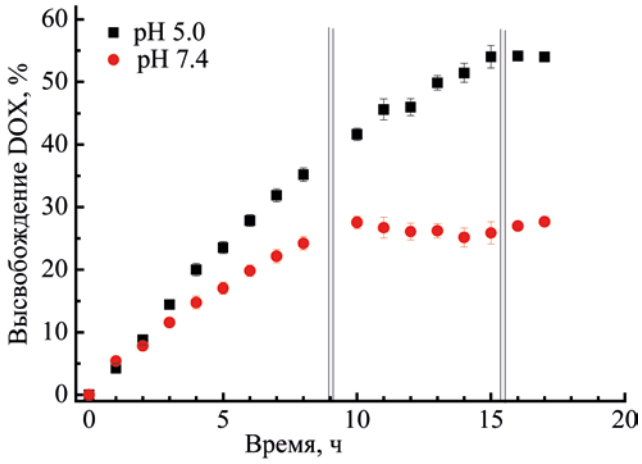


Рис. 7. Высвобождение DOX из агрегатов VR–Alg в ацетатном (pH 5.0) и фосфатном (pH 7.4) буферах при 37°C.

DOX. В качестве внешнего раствора были выбраны фосфатный (pH 7.4) и ацетатный (pH 5.0) буферы, магнитное перемешивание которых осуществляли при 37°C. Эксперимент показал, что в течение первых двух часов высвобождение DOX происходит одинаково в обоих буферах, после чего высвобождение DOX в нейтральной среде замедляется (рис. 7). После 10 ч диализа высвобождение препарата в нейтральной среде достигает 28% и выходит на плато. Нужно отметить, что в области pH 7.4 положительный заряд DOX может несколько ослабляться, снижая вклад конкурентного электростатического взаимодействия с полимером в процессах связывания/высвобождения, что будет способствовать пролонгированному высвобождению лекарства. В кислой среде чуть более 50% DOX высвобождается за 15 ч. Метод ДРС показал, что в буферной среде размеры агрегатов VR–Alg и VR–Alg–DOX возрастают относительно размеров этих агрегатов в воде, причем наибольшее увеличение наблюдается в фосфатном буфере (рис. S4, см. Дополнительные материалы). Вероятной причиной ускоренного высвобождения DOX в кислой среде, возможно, является то, что молекула DOX существует полностью в протонированной форме. Это может инициировать ее высвобождение из смешанной системы из-за конкурентного связывания Alg с VR.

По завершении физико-химических исследований были приготовлены образцы для скрининга биологических свойств. Поскольку для связывания DOX наиболее оптимальной системой является смешанный раствор VR–Alg в соотношении 1:50, на первом этапе исследования биологических свойств были протестированы водные растворы Alg в отсутствие и в присутствии VR. Для данных растворов значения IC_{50} по отношению к нормальным (Chang liver) и опухолевым (M-HeLa) клеткам превышают 50 мкМ., т. е. эти растворы не проявляют цитотоксического действия (табл. 1). В случае применения индивидуального раствора Alg для связывания DOX наблюдается избирательное усиление цитотоксичности по отношению к опухолевым клеткам и снижение цитотоксичности по отношению к нормальным клеткам. Присутствие макроцикла VR сохраняет цитотоксическую активность по отношению к M-HeLa, но немного по-

Таблица 1. Цитотоксичность индивидуальных растворов Alg и DOX, смешанных систем VR–Alg, VR–Alg–DOX в отсутствие и в присутствии солюбилизированных антиоксидантов кверцетина и олеиновой кислоты

Композиция	M-HeLa	Chang liver
	IC_{50} Alg, мкМ.	
Alg	> 50	> 50
VR–Alg (1:50)	> 50	> 50
	IC_{50} DOX, мкМ.	
DOX	3.0±0.1	2.0±0.1
Alg–DOX	2.6±0.1	5.8±0.6
VR–Alg (1:50)–DOX	2.6±0.1	4.6±0.5
VR–Alg (1:50)–DOX–кверцетин	3.4±0.1	6.4±0.6
VR–Alg (1:50)–DOX–олеиновая кислота	2.4±0.1	7.6±0.8

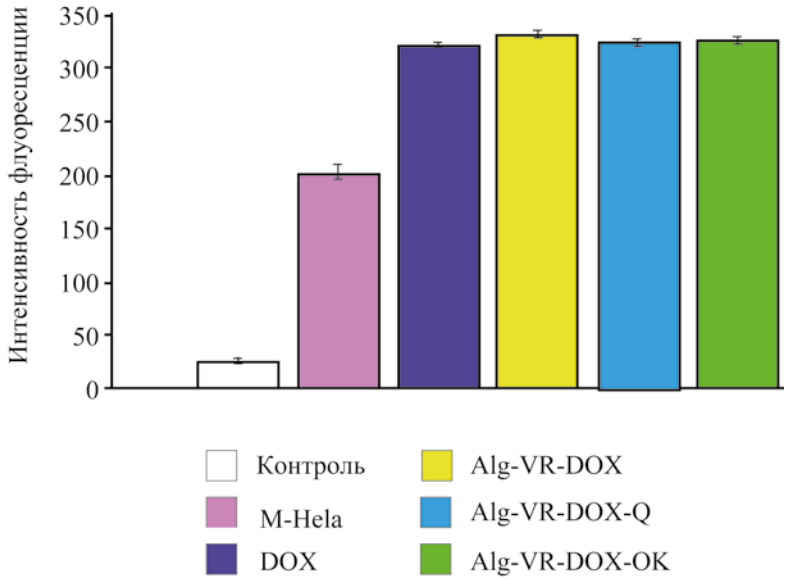


Рис. 8. Внутриклеточное поглощение DOX, измеренное методом проточной цитометрии.

вышает цитотоксичность по отношению к Chang liver (табл. 1). Для того, чтобы снизить цитотоксичность по отношению к нормальной клеточной линии, композиция VR–Alg (1:50) была использована для инкапсуляции не только DOX, но и гидрофобных антиоксидантов (кверцетина и олеиновой кислоты). В результате одновременного связывания DOX и антиоксидантов наблюдалось понижение цитотоксичности, причем добавка кверцетина к агрегатам, содержащим DOX, снижает цитотоксичность по отношению к обеим клеточным линиям. Наиболее селективной оказалась композиция, содержащая DOX и олеиновую кислоту, для которой индекс селективности превышает 3. Вероятной причиной пониженного цитотоксического действия к нормальным клеткам является комплексообразование между DOX и олеиновой кислотой [18], что препятствует проникновению лекарства в эти клетки.

Распределение DOX в опухолевых клетках оценивали при помощи метода проточной цитофлуориметрии. Было показано, что инкапсулированная форма DOX проявляет наибольшую интенсивность флуоресценции по сравнению со свободной формой DOX (рис. 8). Однако исследование методом флуоресцентной микроскопии после окрашивания ДНК красителем DAPI обнаружило сходные изменения в морфологии клеточных ядер при обработке клеток как свободным, так и инкапсулированным DOX (рис. 9). Таким образом, обе формы DOX вызывают характерную для апоптоза фрагментацию ядер, но наличие олеиновой кислоты способно увеличить селективность действия DOX.

Таким образом, в работе впервые изучена супрамолекулярная система на основе альгината натрия и виологенового каликс[4]резорцина в качестве наноконтейнера для DOX. В водном растворе Alg реализуется спонтанное формирование наночастиц в присутствии небольшого количества VR при соотношении VR:Alg = 1:50. Данное соотношение компонентов обеспечивает полное связывание DOX наночастицами и не требует проведения диализа с целью отделения незакапсулированного лекарства. DOX, связанный агрегатами на основе VR–Alg, по селективности действия по отношению к опухолевым клеткам значительно превосходит действие свободного DOX. Инкапсулированная форма DOX способна проникать в опухолевые клетки и проявлять цитотоксическое действие, вероятно, за счет индукции апоптоза, которая может снизиться в нормальных клетках благодаря одновременному присутствию в наноконтейнерах гидрофобных антиоксидантов. Полученные результаты могут быть полезны при создании эф-

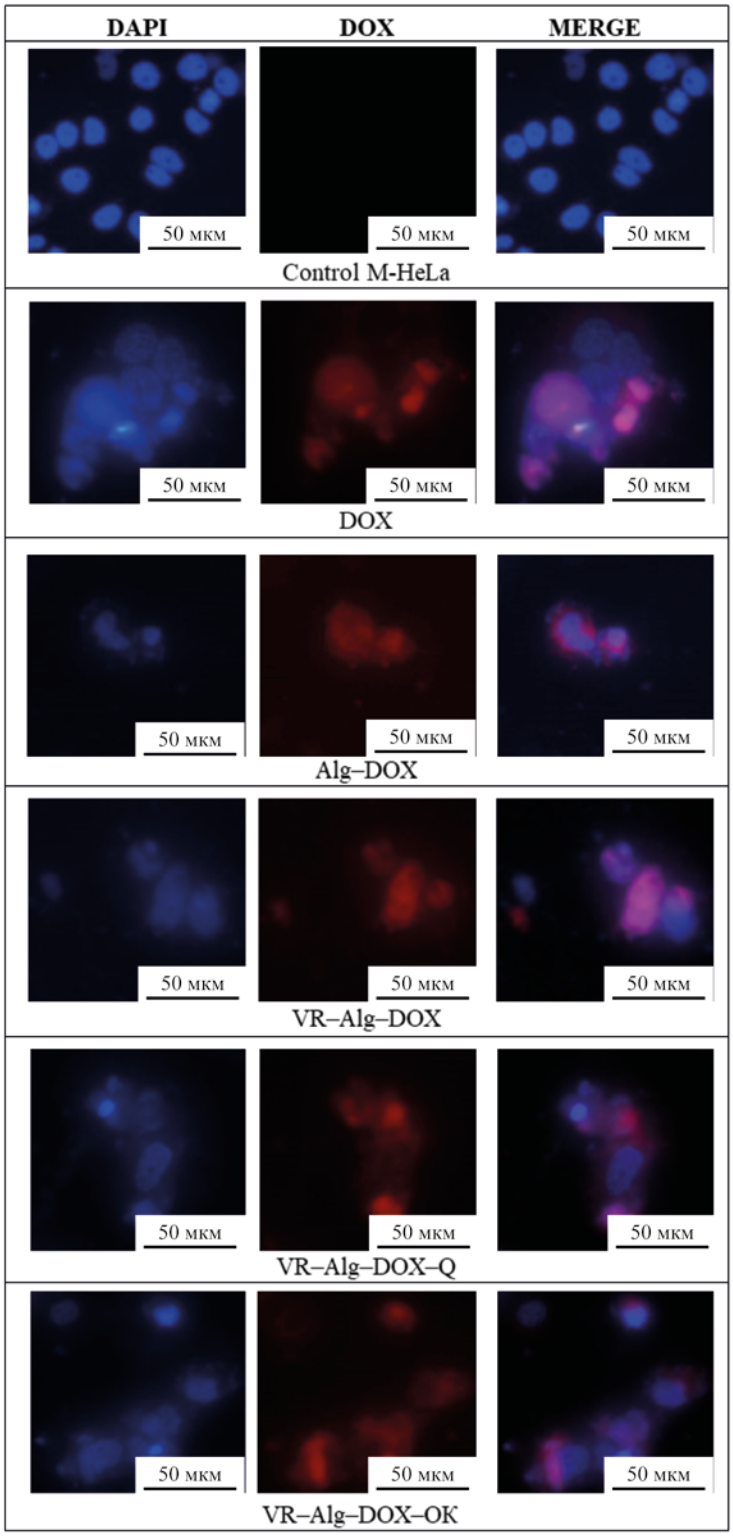


Рис. 9. Изображения флуоресцентной микроскопии клеток M-HeLa, инкубированных со свободным и инкапсулированным DOX.

фективных наноносителей доксорубицина в противораковой терапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез VR описан в работе [15]. Альгинат натрия (Acros Organics) и гидрохлорид доксорубицина (>90%, Toronto Research Chemicals) использовали без дополнительной очистки. Растворы готовили в деионизированной воде (18.2 MΩ), полученной на системе очистки воды Millipore Direct-Q 5 UV (Molsheim, Франция). Растворы полимера и макроцикла готовили путем растворения твердой навески вещества в определенном объеме воды при перемешивании на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре. Молярную концентрацию Alg рассчитывали относительно мономерного звена. Смешанные растворы VR–Alg готовили простым смешиванием различных объемов исходных водных растворов полимера и макроцикла в определенном соотношении. Фосфатный буфер готовили с использованием таблеток PBS (Sigma-Aldrich). Для приготовления натрий-ацетатного буфера 2.886 г безводного ацетата натрия растворяли в 400 мл деионизированной воды, добавляли 0.848 мл ледяной уксусной кислоты (ρ 1.0492 г/см^3), затем разбавляли водой до 500 мл.

Для определения электропроводности использовали кондуктометр InoLab Cond 720 (WTW GmbH, Германия), оснащенный графитовым электродом. Для измерения pH растворов использовали pH-метр HI 2110 (Hanna Instruments, США). Все измерения проводили при 25°C, повторяли не менее трех раз и определяли среднее значение. Гидродинамический диаметр частиц и их дзета-потенциал измеряли на анализаторе частиц Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания) с гелий-неоновым лазером мощностью 4 мВт, работающим на длине волны 632.8 нм. Обратно рассеянный свет регистрировали при 173°, а среднечисловой гидродинамический диаметр рассчитывался по уравнению Стокса–Эйнштейна. Все измерения ДРС повторяли не менее 5 раз при температуре 25±0.1°C. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения DTS 5.10. Спектры поглощения измеряли в кварцевых кюветах толщиной 1 и 10 мм с помощью спектрофотометра Specord 250 Plus (Analytic Jena, Германия) при 25°C. Спектры флуоресценции DOX снимали на спектрофлуориметре Hitachi F-7100 (Hitachi, Япония). Длина волны возбуждения составляла 481 нм, спектры испускания наблюдали в диапазоне 490–700 нм. Измерения проводили в 10-мм кварцевой кювете при ширине спектральных щелей 5 нм. Изображения ПЭМ получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7800 (Hitachi, Япония). Микроскоп работал при ускоряющем напряжении 80 кВ. Перед съемкой 5 мкл раствора помещали на покрытую формваром медную сетку диаметром 3 мм, после чего высушивали при комнатной температуре в течение 24 ч.

Для количественной оценки профиля высвобождения DOX из агрегатов VR–Alg проводили диализ с использованием мембраны Slider-A-Lyzer (Thermo FS, США) с размером пор 2 кДа. Высвобождение DOX изучали в ацетатном (pH 5.0) и фосфатном (pH 7.4) буферах при 37°C. Объем пробы составил 4 мл, объем внешнего буферного раствора – 250 мл. Высвобождение DOX контролировали флуориметрически по его содержанию во внешнем буфере. Концентрацию DOX определяли по интенсивности флуоресценции при 555 нм по калибровочным кривым (рис. S5, см. Дополнительные материалы).

Для экспериментов по цитотоксичности использовали культуру опухолевых клеток M-HeLa клон 11 (эпителиоидный рак шейки матки, сублиния HeLa, клон M-HeLa из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) и линию клеток печени человека (Chang liver) из коллекции НИИ Вирусологии РАМН (Москва). Клетки культивировали на стандартной питательной среде Игла, изготовленной в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАН (компания «ПанЭко»), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% незаменимых аминокислот.

Цитотоксическое действие на клетки определяли с помощью колориметрического метода клеточной пролиферации – MTT-теста [19]. Значения IC_{50} были рассчитаны с использованием онлайн-калькулятора MLA - Quest Graph™ IC50 Calculator AAT Bioquest, Inc, 8 февраля 2023 г. (AAT Bioquest Inc. Quest Graph™ IC_{50} Calculator https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator). Эксперименты были повторены трижды, и результаты представлены как

среднее значение±стандартное отклонение.

Оценку поглощения DOX клетками M-HeLa проводили методом проточной цитометрии. Необработанные клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки высевали в 24-луночные планшеты по 5×10^4 клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч, затем клетки культивировали с тестируемыми растворами. К контрольным клеткам добавляли свежую культуральную среду без тест-композиций. После обработки клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером для удаления наночастиц, не проникших в клетки. Затем клетки трипсинизировали и ресуспендировали в свежем фосфатном буфере. Суспензии клеток анализировали на приборе Guava easy Cyte (Merck Millipore, США).

Для флуоресцентной микроскопии ядра клеток окрашивали DAPI. После обработки исследуемыми составами фотосъемку проводили на вертикальном моторизованном флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse Ci-S (Nikon, Китай) при увеличении ×400.

В рамках данной работы эксперименты с животными не проводились.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кашапов Руслан Равилевич ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8019-353X

Разуваева Юлия Сергеевна ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1417-7416

Зиганшина Альбина Юлдузовна ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4507-9923

Сапунова Анастасия Сергеевна ORCID: https://orcid.org/ 0000-0002-4355-1430

Волошина Александра Дмитриевна ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3540-8554

Сальников Вадим Владимирович ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2367-672X

Захарова Люция Ярулловна ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2981-445X

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-73-10050).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Л.Я. Захарова является членом редколлегии Журнала общей химии. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0044460X23060124 для авторизованных пользователей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Designed Molecular Space in Material Science and Catalysis / Ed. S. Shirakawa. Singapore: Springer, 2018. P. 183.
2. *Миргородская А.Б., Кушназарова Р.А., Ленина О.А., Петров К.А., Захарова Л.Я.* // ЖОХ. 2023. Т. 93. Вып. 3. С. 483; *Mirgorodskaya A.B., Kushnazarova R.A., Lenina O.A., Petrov K.A., Zakharova L.Ya.* // Russ. J. Gen. Chem. 2023. Vol. 93. P. 593. doi 10.1134/S1070363223030167
3. *Кушназарова Р.А., Миргородская А.Б., Михайлов В.А., Белоусова И.А., Зубарева Т.М., Прокопьева Т.М., Волошина А.Д., Амерханова С.К., Захарова Л.Я.* // ЖОХ. 2022. Т. 92. Вып. 4. С. 630; *Kushnazarova R.A., Mirgorodskaya A.B., Mikhailov V.A., Belousova I.A., Zubareva T.M., Prokop'eva T.M., Voloshina A.D., Amerhanova S.K., Zakharova L.Y.* // Russ. J. Gen. Chem. 2022. Vol. 92. N 4. P. 659. doi 10.1134/S1070363222040077
4. *Wang J., Ding X., Guo X.* // Adv. Colloid Interface Sci. 2019. Vol. 269. P. 187. doi 10.1016/j.cis.2019.04.004
5. *Антипин И.С.,Алфимов М.В., Арсланов В.В., Бурилов В.А., Вацадзе С.З., Волошин Я.З., Волчо К.П., Горбачук В.В., Горбунова Ю.Г., Громов С.П., Дудкин С.В., Зайцев С.Ю., Захарова Л.Я., Зиганшин М.А., Золотухина А.В., Калинина М.А., Караханов Э.А., Кашапов Р.Р., Койфман О.И., Коновалов А.И., Коренев В.С., Максимов А.Л., Мамардашвили Н.Ж., Мамардашвили Г.М., Мартынов А.Г., Мустафина А.Р., Нугманов Р.И., Овсянников А.С., Падня П.Л., Потапов А.С., Селектор С.Л., Соколов М.Н., Соловьева С.Е., Стойков И.И., Стужин П.А., Суслов Е.В., Ушаков Е.Н., Федин В.П., Федоренко С.В., Федорова О.А., Федоров Ю.В., Чвалун С.Н., Цивадзе А.Ю., Штыков С.Н., Шурпик Д.Н., Щербина М.А., Якимов Л.С.* // Усп. хим. 2021. Т. 90. Вып. 8. С. 895; *Antipin I.S., Alfimov M.V., Arslanov V.V., Burilov V.A., Vatsadze S.Z., Voloshin Ya.Z., Volcho K.P., Gorbatchuk V.V., Gorbunova Yu.G., Gromov S.P., Dudkin S.V., Zaitsev S.Yu., Zakharova L.Ya., Ziganshin M.A.,*

Zolotukhina A.V., Kalinina M.A., Karakhanov E.A., Kashapov R.R., Koifman O.I., Konovalov A.I., Korenev V.S., Maksimov A.L., Mamardashvili N.Zh., Mamardashvili G.M., Martynov A.G., Mustafina A.R., Nugmanov R.I., Ovsyannikov A.S., Padnya P.L., Potapov A.S., Selektor S.L., Sokolov M.N., Solovieva S.E., Stoikov I.I., Stuzhin P.A., Suslov E.V., Ushakov E.N., Fedin V.P., Fedorenko S.V., Fedorova O.A., Fedorov Yu.V., Chvalun S.N., Tsivadze A.Yu., Shtykov S.N., Shurpik D.N., Shcherbina M.A., Yakimova L.S. // Russ. Chem. Rev. 2021. Vol. 90. N 8. P. 895. doi 10.1070/RCR5011

6. *Кашапов Р.Р., Миргородская А.Б., Кузнецов Д.М., Разуваева Ю.С., Захарова Л.Я.* // Коллоидн. ж. 2022. Т. 84. Вып. 5. С. 503. // *Kashapov R.R., Mirgorodskaya A.B., Kuznetsov D.M., Razuvaeva Yu.S., Zakharova L.Ya.* // Colloid J. 2022. Vol. 84. P. 502. doi 10.1134/S1061933X22700016
7. *Razuvayeva Y., Kashapov R., Zakharova L.* // Supramol. Chem. 2020. Vol. 32. N 3. P. 178. doi 10.1080/10610278.2020.1725515
8. *Peng S., Wang K., Guo D.S., Liu Y.* // Soft Matter. 2015. Vol. 11. P. 290. doi 10.1039/c4sm02170c
9. *Wang K., Guo D.-S., Zhao M.-Y., Liu Y.* // Chem. Eur. J. 2016. Vol. 22. P. 1475. doi 10.1002/chem.201303963
10. *Harangozó J.G., Wintgens V., Miskolczy Z., Amiel C., Biczók L.* // Colloid. Polym. Sci. 2016. Vol. 294. P. 1807. doi 10.1007/s00396-016-3947-y
11. *Wintgens V., Guigner J.-M., Miskolczy Z., Amiel C., Biczók L.* // Carbohydr. Polym. 2019. Vol. 223. P. 115071. doi 10.1016/j.carbpol.2019.115071
12. *Jin G., Ngo H.V., Cui J.H., Wang J., Park C., Lee B.J.* // Pharmaceutics. 2021. Vol. 13. P. 662. doi 10.3390/pharmaceutics13050662
13. *Hwang E., Seo S., Bak S., Lee H., Min M., Lee H.* // Adv. Mater. 2014. Vol. 26. P. 5129. doi 10.1002/adma.201401201
14. *Frent O.D., Vicas L.G., Duteanu N., Morgovan C.M., Jurca T., Pallag A., Muresan M.E., Filip S.M., Lucaciu R.L., Marian E.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. P. 12108. doi 10.3390/ijms232012108
15. *Kashapov R., Razuvayeva Y., Ziganshina A., Sapunova A., Lyubina A., Amerhanova S., Kulik N., Voloshina A., Nizameev I., Salnikov V., Zakharova L.* // J. Mol. Liq. 2022. Vol. 345. P. 117801. doi 10.1016/j.molliq.2021.117801
16. *Yoncheva K., Merino M., Shenol A., Daskalov N.T., Petkov P.S., Vayssilov G.N., Garrido M.J.* // Int. J. Pharm. 2019. Vol. 556. P. 1. doi 10.1016/j.ijpharm.2018.11.070
17. *Xue Y., Xia X., Yu B., Luo X., Cai N., Long S., Yu F.* // RSC Adv. 2015. Vol. 5. P. 73416. doi 10.1039/c5ra13313k
18. *Munnier E., Tewes F., Cohen-Jonathan S., Linassier C., Douziech-Eyrolles L., Marchais H., Soucé M., Hervé K., Dubois P., Chourpa I.* // Chem. Pharm. Bull. 2007. Vol. 55. P. 1006. doi 10.1248/cpb.55.1006
19. *Smolobochkin A.V., Gazizov A.S., Yakhshilikova L.J., Bekrenev D.D., Burilov A.R., Pudovik M.A., Lyubina A.P., Amerhanova S.K., Voloshina A.D.* // Chem. Biodivers. 2022. Vol. 19. P. e202100970. doi 10.1002/cbdv.202100970

Development of A Complex of Doxorubicin with Nanoparticles Based on Sodium Alginate and Viologen Calix[4]resorcinol to Increase Selectivity of Cytotoxic Action

R. R. Kashapov[a,*], Yu. S. Razuvaeva[a], A. Yu. Ziganshina[a], A. S. Sapunova[a], A. D. Voloshina[a], V. V. Salnikov[b], L. Ya. Zakharova[a]

[a] *A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, 420088 Russia*
[b] *Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, 420111 Russia*
**e-mail: kashapov@iopc.ru*

Received April 18, 2023; revised May 20, 2023; accepted May 21, 2023

A biocompatible supramolecular system based on sodium alginate and viologen calix[4]resorcinol for encapsulation of doxorubicin hydrochloride (DOX) was obtained. Using a set of physicochemical methods, the polymer–macrocycle ratio was found, at which stable nanoparticles are formed, and their morphological characteristics were determined. It was shown that with an increase in the concentration of calix[4]resorcinol, the size of nanoparticles increases and the zeta potential changes from negative to positive values. It was established that the most optimal supramolecular system for DOX binding is a composition with a macrocycle–polymer ratio of 1:50, and a change in the ratio of components can initiate drug release. The effect of encapsulated DOX on the physicochemical and biological properties of the supramolecular system was shown.

Keywords: calixarene, self-assembly, complex formation, encapsulation, cytotoxicity, aggregation