

СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ И ВИОЛОГЕНОВОГО КАЛИКС[4]РЕЗОРЦИНА ДЛЯ ИНКАПСУЛЯЦИИ ГИДРОФОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2023 г. Р. Р. Кашапов^{1,*}, Ю. С. Разуваева¹, А. Ю. Зиганшина¹, А. С. Сапунова¹,
А. Д. Волошина¹, В. В. Сальников², Л. Я. Захарова¹

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 14 апреля 2023 г.

После доработки 14 апреля 2023 г.

Принято к печати 17 апреля 2023 г.

Работа посвящена исследованию супрамолекулярной системы на основе виологенового каликс[4]-резорцина и альгината натрия в водной среде с привлечением набора физико-химических методов. Установлено, что альгинат натрия и виологеновый каликс[4]резорцин в диапазоне концентрационных соотношений макроцикл:полимер от 1:2 до 1:10 образуют стабильные наночастицы, способные инкапсулировать гидрофобные биологически активные вещества. Исследование цитотоксических свойств данных наночастиц в присутствии инкапсулированных субстратов показало увеличение селективности действия кверцетина и олеиновой кислоты по отношению к опухолевым клеткам М-HeLa в 2.47 и 1.14 раза соответственно.

Ключевые слова: каликсарен, полимер, самосборка, комплексообразование, солубилизация, цитотоксичность

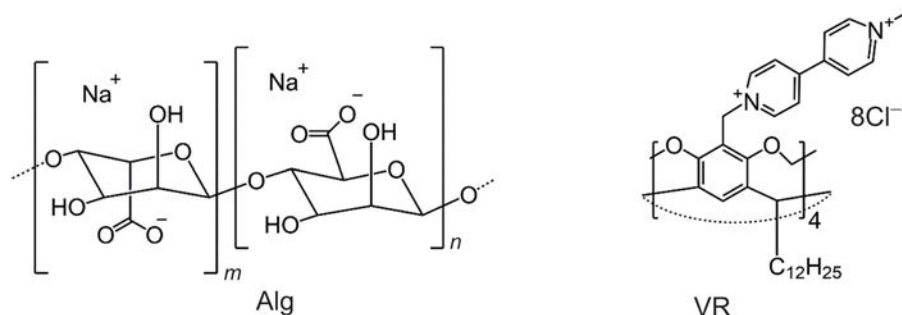
DOI: 10.31857/S00444460X23050153, **EDN:** DDCGOC

В настоящее время активно исследуются супрамолекулярные системы на основе полиэлектролитов и противоположно заряженных ионных ПАВ, интерес к которым возрос в последние несколько лет ввиду создания широкого спектра новых функциональных систем для решения различных прикладных задач [1–4]. Способность к совместной самоорганизации этих молекулярных блоков с образованием функциональных наноразмерных частиц лежит в основе супрамолекулярного подхода к разработке новых многоцелевых агентов. Такой подход позволяет без применения специальных условий (синтетических процедур, высо-

кой температуры, органических растворителей) получать нетоксичные функциональные системы с высокой эффективностью загрузки субстратов и стимул-чувствительными свойствами, что является актуальным для современной фундаментальной науки и фармацевтической химии.

Биополимер альгинат натрия, получаемый из морских водорослей, представляет собой линейный гетерополимер, содержащий 1,4-связанные α -L-глюкуроновую кислоту и β -D-маннуриновую кислоту (схема 1) [5]. Он находит множество применений в различных современных технологиях в области пищевой и биомедицинской промышлен-

Схема 1.



ности. Одним из основных преимуществ альгината является простота приготовления гидрогеля путем сшивания ионами многовалентных металлов без использования токсичных химических веществ и жестких условий [6, 7]. В качестве сшивающего агента применяется двухвалентный ион Ca^{2+} [8, 9], а в недавних публикациях ион Zn^{2+} также использовали для приготовления гелей, микро- и наночастиц [10, 11]. Альгинатные гидрогели широко изучаются именно с перспективой применения для доставки лекарств [7, 9, 12]. Капсулы альгината стабильны в кислой среде желудка, но набухают в основной среде кишечника и высвобождают инкапсулированное лекарство [13], поэтому представляют собой идеальный полисахарид для доставки лекарств в толстую кишку. Кроме этого, комплексы альгинатов с металлами важны для медицинской практики, поскольку они способны укреплять иммунную систему [14] и предотвращать развитие онкологических [15], сердечно-сосудистых [16] и почечных заболеваний [17].

Помимо использования катионов металлов, возможно применение органических противоионов для супрамолекулярных взаимодействий с производными альгината. Смешанные наночастицы можно получать в результате электростатических взаимодействий между альгинатом и катионным полимером, например, хитозаном [18, 19]. Данным способом можно модифицировать поверхности наноразмерных частиц различной природы, а именно липосом [20], металлических [21] и полимерных наночастиц [22, 23]. Полимерная оболочка в виде альгината способствует повышению стабильности частиц [20, 23], улучшенному проникновению в клетки и регулированию иммунного ответа

[24]. Кроме формирования супрамолекулярных систем с противоположно заряженными полимерами и наночастицами, молекулы ПАВ широко используются при создании полимер-коллоидных комплексов [25, 26], которые находят применение в медицине [3, 27], косметологии [28, 29], нефтяной [30, 31] и пищевой промышленности [32, 33]. Для получения альгинатных наночастиц также могут быть использованы противоположно заряженные ПАВ. Миртич и соавторы сравнили комплексообразование альгината с катионами металлов, полимерами и ПАВ [34]. Было показано, что использование ПАВ приводит к формированию самых маленьких частиц с наименьшей полидисперсностью и с самым низким дзета-потенциалом среди исследованных сшивающих агентов. Янг и соавторы [35] показали, что во взаимодействиях между альгинатом и ПАВ преобладающую роль играет электростатическое притяжение, а при понижении pH межмолекулярные взаимодействия дополнительно стабилизировались гидрофобным эффектом. В литературе также представлен ряд работ, посвященных исследованию агрегации катионных ПАВ в присутствии альгината. Взаимодействие альгината с ПАВ индуцирует образование мицелл при концентрациях ПАВ ниже их критической концентрации агрегации (ККА) [36–38]. Помимо традиционных открытоцепных ПАВ макроциклический амфифил, а именно катионный каликс[4]-резорцин, может также электростатически взаимодействовать с альгинатным полиэлектролитом [39]. Как и в случае с традиционными амфифилами, в присутствии полимера значение ККА амфифила снижается, а в растворе формируются стабильные частицы, размер которых зависит от

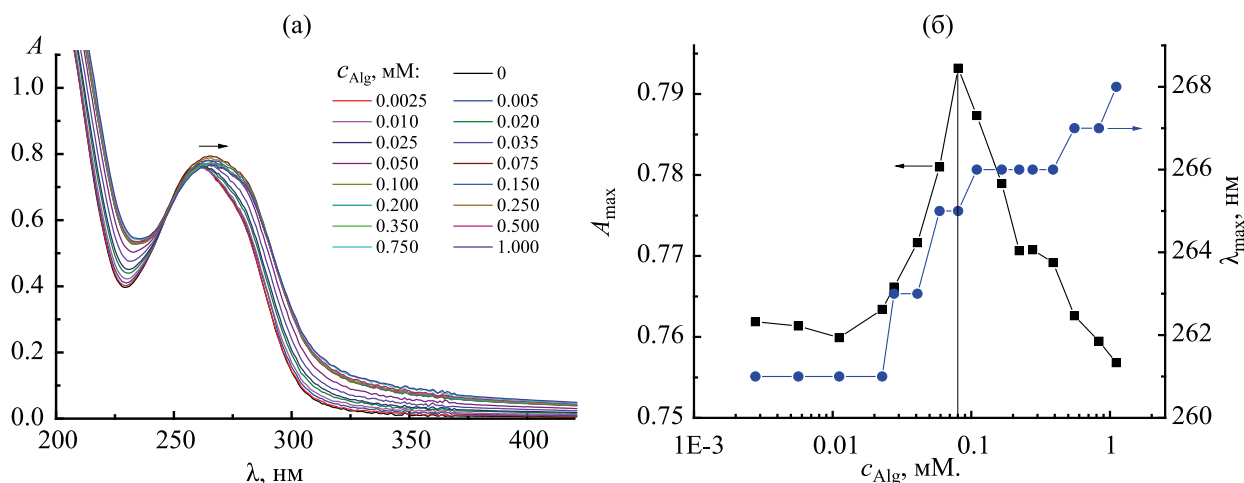


Рис. 1. УФ спектры водных растворов 0.01 mM. VR в отсутствие и в присутствии различной доли Alg (оптический путь – 1 см) (а) и соответствующая им зависимость максимального поглощения (шкала слева) и длины волны этого поглощения (шкала справа) от концентрации Alg (б).

длины гидрофобных заместителей и природы головной группы макроцикла. Для сшивки альгината можно использовать мицеллы цетилпиридиний хлорида [40], которые проявляют антибактериальные свойства [40] и могут выступать в качестве наноконтейнера для липофильного лекарства ибупрофена [27]. Наночастицы на основе композиции альгинат–Твин 80–геминальное катионное ПАВ использовали для связывания капсаицина [41]. Как видно из представленных выше литературных данных, агрегация в смешанных системах альгината и ПАВ широко изучена, однако применение этих композиций в качестве систем доставки лекарств недостаточно исследовано.

Данная работа посвящена изучению надмолекулярных агрегатов, образующихся в растворах полианиона альгината натрия (Alg) и катионного кавитанда, а именно виологенового каликс[4]-резорцина, содержащего *n*-додецильные заместители на нижнем ободе (VR) (схема 1). Выбор макроцикла обусловлен нацеленностью виологеновых групп на митохондрии клеток [42], которые рассматриваются в качестве мишени в рамках новых перспективных методов лечения рака [43], сердечной недостаточности [44], резистентности к инсулину [45] и нарушений в работе мозга [46]. В предыдущих работах мы показали низкую токсичность виологенового макроцикла [47,48] и его

способность образовывать смешанные агрегаты с анионными ПАВ [49]. В данной работе набором физико-химических методов была исследована агрегация в бинарной системе VR–Alg с образованием наночастиц, определены размеры агрегатов и оценены их биологические свойства. Полученные агрегаты были исследованы в качестве наноконтейнеров для липофильных биологически активных веществ, а именно флавоноида кверцетина и олеиновой кислоты.

На первом этапе исследований было изучено взаимодействие Alg с виологеновым каликс[4]-резорцином при помощи спектрофотометрии. Виологеновый каликс[4]резорцин имеет характеристическую полосу поглощения при 261 нм, в то же время поглощение Alg в этой области спектра незначительно. Титрование водного раствора виологенового каликс[4]резорцина с концентрацией 0.01 mM. показало, что с увеличением содержания Alg наблюдается возрастание интенсивности поглощения с батохромным сдвигом его максимума, а затем снижение интенсивности поглощения (рис. 1а). Если построить зависимость максимума поглощения от молярной концентрации Alg, рассчитанной относительно мономерного звена Alg, то максимальное значение интенсивности на данной зависимости наблюдалось в смеси с 8-кратным избытком Alg (рис. 1б). Максимум

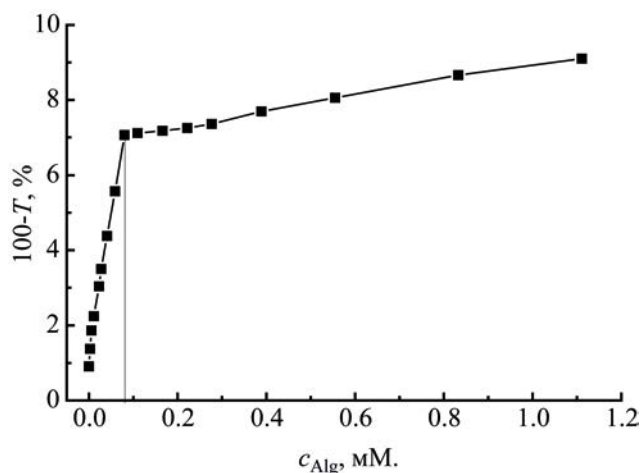


Рис. 2. Зависимость мутности смешанной системы VR–Alg от концентрации Alg при фиксированной концентрации VR 0.01 mM. в воде (λ 450 nm, l 10 mm, 25°C).

поглощения при титровании смещается вправо с 261 до 268 nm, что говорит об изменении микроокружения молекул VR в присутствии Alg. Стоит отметить, что соотношение VR:Alg = 1:8 является эквизарядным, поскольку на одну молекулу макроцикла приходится восемь положительных зарядов четырех виологеновых групп, а каждое мономерное звено Alg содержит по одной ацетатной группе (схема 1). Метод турбидиметрического титрования также показал, что добавление одного компо-

нента к другому приводит к резкому возрастанию мутности до достижения соотношения VR:Alg = 1:8 (рис. 2). При дальнейшем увеличении концентрации Alg эти агрегаты не разрушаются и мутность не снижается, что отражается на отсутствии снижения оптической плотности после достижения 8-кратного избытка полимера. Таким образом, каждая молекула VR при связывании с Alg ориентирует вокруг себя восемь мономерных звеньев полимерной молекулы, что указывает на электростатическую природу взаимодействия между VR и Alg.

Значение удельной электропроводности в водных растворах индивидуального Alg линейно возрастает в диапазоне концентраций до 0.5 mM. (рис. 3а). В присутствии VR при увеличении содержания Alg в растворе до 8-кратного избытка значение электропроводности не меняется и остается на уровне свободного макроцикла (рис. 3а), что подтверждает формирование наночастиц за счет электростатического взаимодействия макроцикла с полимером и взаимной компенсации заряда виологеновых групп макроцикла и ацетатных групп полимера при соотношении VR:Alg = 1:8. При последующем добавлении Alg электропроводность смешанных растворов идентична электропроводности растворам индивидуального полимера, что указывает на появление свободных молекул полимера, не участвующих во взаимо-

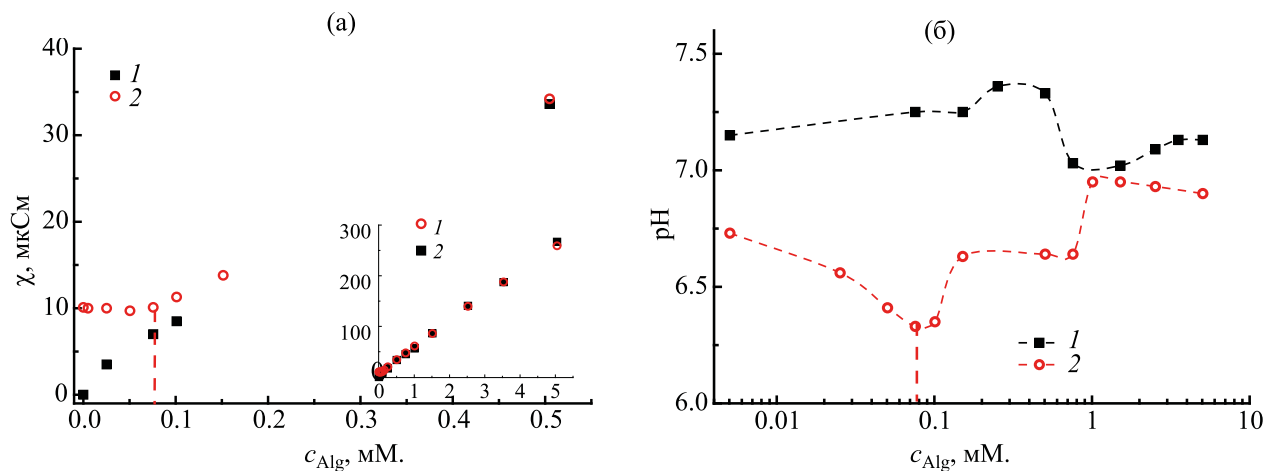


Рис. 3. Зависимость удельной электропроводности (а) и pH (б) от концентрации Alg для смешанной системы VR–Alg (1) и индивидуального раствора Alg (2) при фиксированной концентрации VR (0.01 mM.) при 25°C.

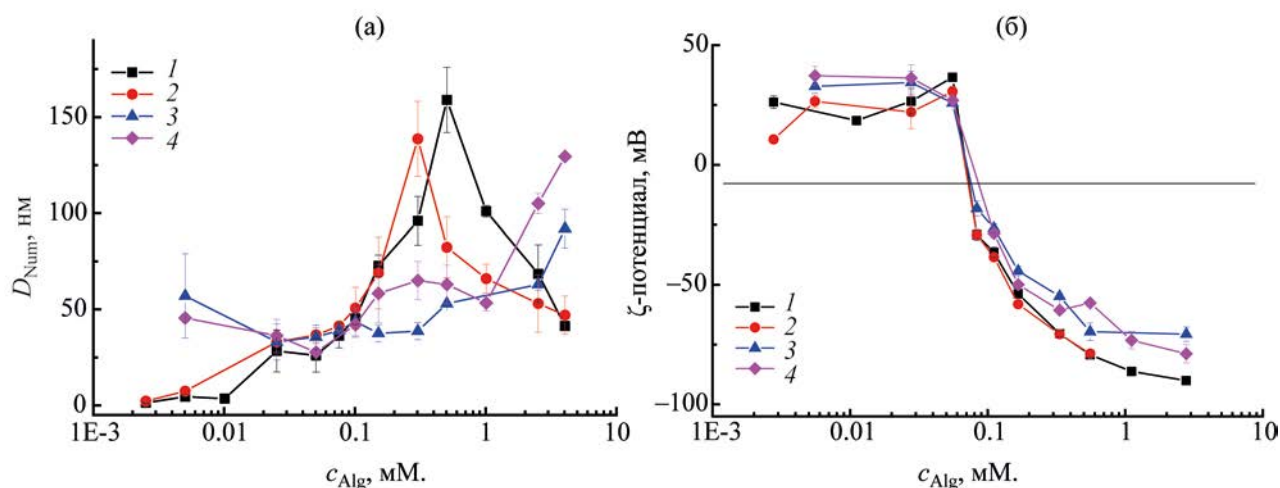


Рис. 4. Зависимость размера (а) и дзета-потенциала (б) частиц в смешанной системе VR–Alg от концентрации Alg при фиксированной концентрации VR 0.01 мМ. при 25°C. 1 – свежеприготовленный образец, 2 – через 1 сут, 3 – через 7 сут, 4 – через 14 сут.

действию с виологеновым каликс[4]резорцином в растворе.

Индивидуальный раствор 0.01 мМ. VR обладает pH 6.77, а индивидуальный раствор Alg имеет pH в нейтральной области, но добавление полимера к 0.01 мМ. VR приводит к снижению pH с минимумом, наблюдаемым при соотношении VR:Alg = 1:8 (рис. 3б). Предполагаемой причиной снижения pH в этом концентрационном диапазоне является то, что равновесное состояние нейтральной и анионной форм слабых α -L-глюкуроновой и β -D-маннуровой кислот при взаимодействии с виологеновым каликс[4]резорцином сдвигается в сторону образования анионов. При дальнейшем увеличении избытка полимера значение pH возрастает и приближается к нейтральному значению pH индивидуального полимера.

Формирование агрегатов в смешанном растворе было исследовано методом динамического рассеяния света (ДРС) (рис. 4, S1, см. Дополнительные материалы). В индивидуальном растворе VR с концентрацией 0.01 мМ. наблюдаются только неагрегированные молекулы, а образование агрегатов начинается, когда концентрация Alg в смеси превышает 0.01 мМ. (рис. 4а). При 8-кратном избытке Alg размер агрегатов составляет около

35 нм. Однако максимум значений гидродинамического диаметра наблюдается не при соотношении VR:Alg = 1:8, которое соответствует перезарядке системы (рис. 4б), а при 50–80-кратном избытке полимера, что коррелирует с возрастанием мутности в этом концентрационном диапазоне (рис. 2). Размер агрегатов в этих смешанных растворах в основном составляет 100–150 нм, но в то же время присутствует небольшая доля более крупных частиц с гидродинамическим диаметром 300–600 нм (рис. S1, см. Дополнительные материалы). Возможной причиной образования последних является то, что вновь добавляемый полимер «склеивает» агрегаты, образовавшиеся ранее, в более крупные структуры. За одни сутки хранения при комнатной температуре размер частиц, формируемых в растворах до достижения соотношения VR:Alg = 1:16, практически не изменяются, а в растворах с 20–80-кратным избытком Alg происходит немонокотное изменение размеров. За две недели хранения наиболее стабильные частицы, сохраняющие значения гидродинамического диаметра, наблюдались в растворах с избытком полимера в диапазоне соотношений VR–Alg от 1:2 до 1:10. В течение этого срока значения дзета-потенциала данных растворов претерпевали незначительные изменения.

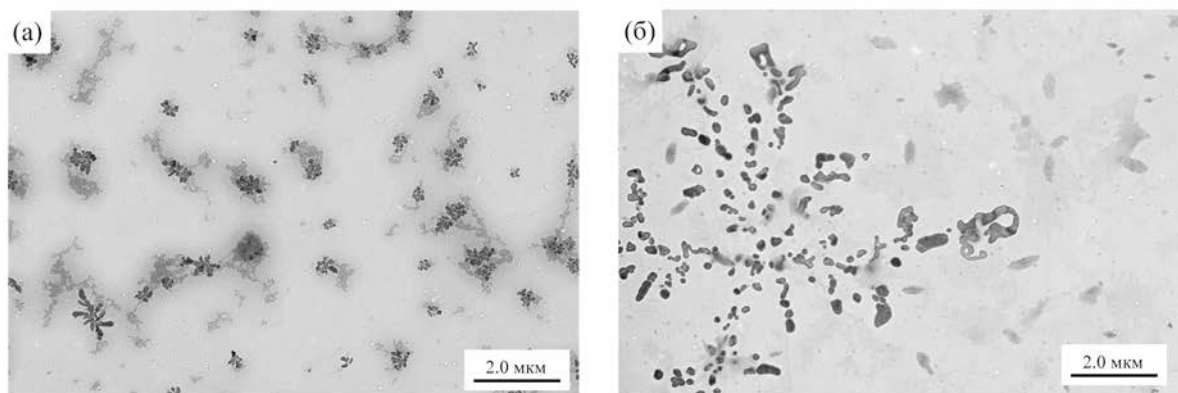


Рис. 5. Изображение ПЭМ для агрегатов, образованных в водной среде VR:Alg = 1:1 (а) и VR:Alg = 1:20 (б).

Убедившись с помощью ДРС в том, что добавление VR в водный раствор Alg приводит к формированию совместных агрегатов, для смешанных систем с соотношением VR:Alg = 1:1 (рис. 5а) и 1:20 (рис. 5б) были получены микрофотографии просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). На данных фотографиях видно наличие несферических агрегатов, размер которых возрастает при увеличении доли полимера, что соотносится с данными ДРС. Несферическая форма агрегатов может свидетельствовать об образовании супрамолекулярных полимеров как в случае формирования комплексов каликс[4]арена с солью виологена [50]. Однако метод ДРС выявил наличие одномодального распределения частиц для эквимольной смеси и бимодального распределения для смеси с избытком Alg с хорошими корреляционными функциями и низкими значениями индекса полидисперсности, что свидетельствует о наличии в растворе однородных сферических частиц. На полученных микрофотографиях также идентифицируется небольшое количество сферических частиц, поэтому не стоит исключать их образование в растворе. Преобладание удлиненных агрегатов на изображениях ПЭМ обусловлено тем, что удаление растворителя во время пробоподготовки изменяет реальные концентрации компонентов. Уменьшение содержания воды в образце сопровождается дегидратацией полярных групп молекул и сближением агрегатов. Аналогичный эффект на-

блюдается как для индивидуального амфифильного раствора виологена [51], так и для смешанных агрегатов с сульфокаликс[4]ареном [52].

Измерение дзета-потенциала частиц в растворах VR–Alg проводили методом электрофоретического рассеяния света. В смеси с избытком VR наблюдается положительное значение дзета-потенциала, обусловленное присутствием виологеновых групп макроцикла. Добавление первых порций Alg к постоянному количеству VR (0.01 mM) до достижения соотношения 1:7 незначительно влияет на положительное значение дзета-потенциала агрегатов (рис. 4б) несмотря на то, что в этом диапазоне соотношений уже наблюдается формирование агрегатов и появление мутности (рис. 1а). Затем с увеличением доли Alg наблюдается резкая перезарядка смешанной системы, и при соотношении VR:Alg = 1:8 дзета-потенциал частиц составляет уже -29 мВ. При последующем увеличении концентрации полимера значение дзета-потенциала постепенно снижается в сторону отрицательных значений, что обусловлено избытком отрицательно заряженных ацетатных групп Alg. Таким образом, комплексом физико-химических методов показано то, что в супрамолекулярных системах на основе VR и Alg формируются наночастицы за счет межмолекулярных электростатических взаимодействий.

Наночастицы на основе VR–Alg были протестированы в качестве солюбилизаторов биологи-

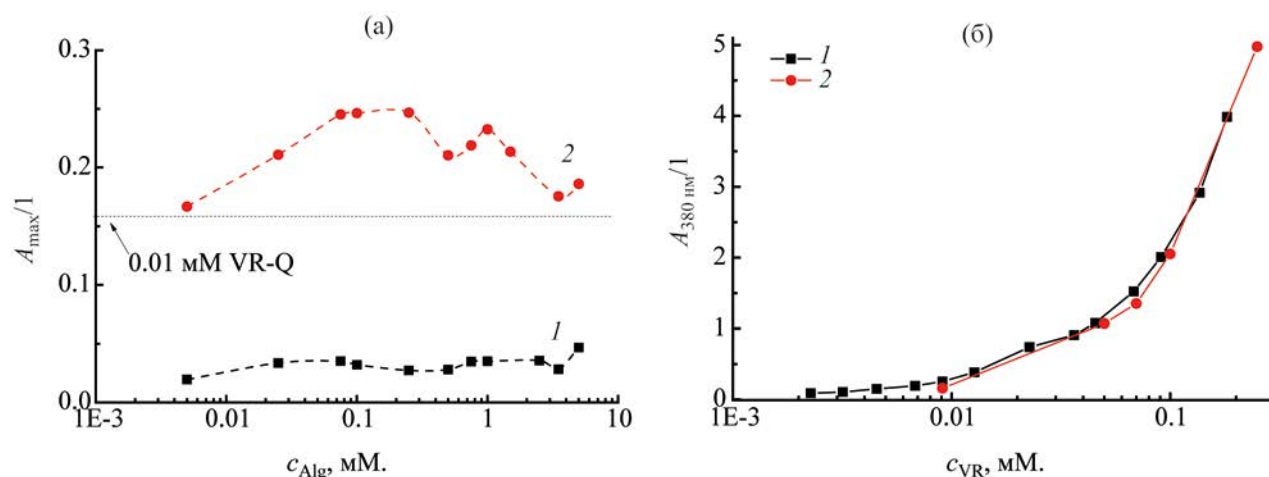


Рис. 6. Солюбилизация кверцетина в растворах Alg (1) и 0.01 mM VR-Alg (2, а), VR (1) и 0.1 mM Alg-VR (2, б) при 25°C.

чески активных субстратов. В качестве одного из них был использован гидрофобный антиоксидант кверцетин. Кверцетин может связываться с индивидуальным макроциклом в водной среде даже при концентрациях макроцикла ниже ККА не только за счет солюбилизации в гидрофобной области агрегатов VR, но также благодаря взаимодействию с виологеновыми группами [47]. В ряде опубликованных работ было показано, что кверцетин может инкапсулироваться в наночастицы на основе Alg за счет водородных связей [53, 54]. Тем не менее проведенный нами эксперимент показал, что количество субстрата, связываемого индивидуальным Alg, очень мало, что указывает на отсутствие гидрофобных доменов в структуре полимера вследствие его малой концентрации (рис. 6а, S2, см. Дополнительные материалы). Было показано, что присутствие Alg в смеси 0.01 mM VR-Alg приводит к увеличению солюбилизационной емкости (рис. 6а), что свидетельствует об увеличенном объеме гидрофобного домена смешанных систем по сравнению с агрегатами на основе индивидуального макроцикла. При сравнении солюбилизационной емкости индивидуального VR и смеси с постоянной долей Alg (0.1 mM) наблюдается незначительное увеличение количества растворенного кверцетина в смеси, но после достижения эквимолярного соотношения компонентов солюбилизация флавоноида в этой смеси идентична наблюдаемой в индивидуальном растворе (рис. 6б).

В отличие от кверцетина другой липофильный субстрат, олеиновая кислота, не имеет характеристических полос поглощения и не флуоресцирует, поэтому было исследовано влияние олеиновой кислоты на интенсивность полосы поглощения при 264 нм, относящейся к VR в составе смеси с Alg при различных соотношениях VR-Alg. Добавление олеиновой кислоты к макроциклу снижает интенсивность его поглощения при 264 нм. Были исследованы три смешанных системы VR-Alg с соотношением компонентов 1:1, 1:8 и 1:50 (рис. 7, S3, см. Дополнительные материалы). Для систем с избытком Alg влияние олеиновой кислоты на интенсивность полосы поглощения макроцикла очень слабое, и наибольшее влияние олеиновой кислоты наблюдается на эквимолярную смесь, причем поглощение снижается при добавлении олеиновой кислоты так же, как и в случае индивидуального VR. Вероятно, основным фактором, обуславливающим возможность взаимодействия олеиновой кислоты и VR в составе комплекса с Alg, являются положительный дзета-потенциал совместных агрегатов, способствующий взаимодействию с карбоксильной группой олеиновой кислоты, и наличие гидрофобных доменов, формируемых *n*-додецильными группами VR (рис. 5а).

После проведения исследования супрамолекулярной системы на основе VR и Alg обширным комплексом физико-химических методов были подготовлены образцы для скрининга биологических свойств. Водные растворы индивидуальных квер-

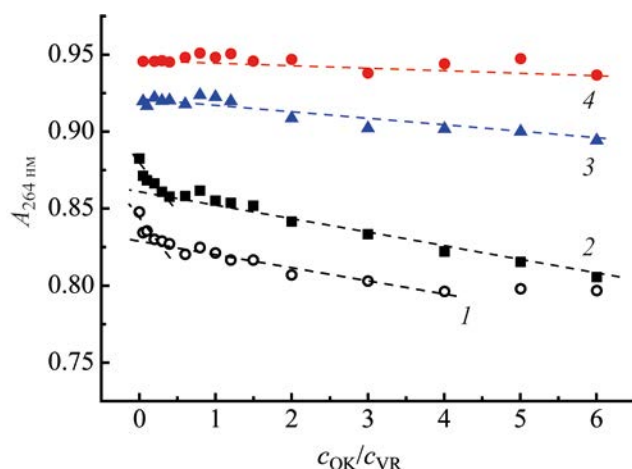


Рис. 7. Зависимость поглощения при 264 нм в водных растворах индивидуального раствора VR и смесей VR–Alg с различными соотношениями компонентов от концентрации олеиновой кислоты (l 10 мм, 25°C). 1 – 0.01 мМ. VR–OK, 2 – 0.01 мМ. VR–0.01 мМ. Alg–OK, 3 – 0.01 мМ. VR–0.08 мМ. Alg–OK, 4 – 0.01 мМ. VR–0.50 мМ. Alg–OK.

цетина и олеиновой кислоты были приготовлены с использованием 2%-ного этанола и обладали пониженным индексом селективности, которое рассчитывается как отношение значения концентрации, вызывающей гибель 50% нормальных клеток Chang liver (IC_{50}), к значению IC_{50} для опухолевых клеток M–HeLa. Индивидуальный Alg не цитотоксичен, а его эквимольный комплекс с VR проявляет цитотоксическое действие с небольшой селективностью по отношению к опухолевым клеткам (табл. 1). Наличие гидрофобных субстратов (кверцетина и олеиновой кислоты) в агрегатах на ос-

нове эквимольного комплекса не оказывает существенного влияния на проявление цитотоксического действия, за исключением случая инкапсулированной олеиновой кислоты по отношению к Chang liver. Небольшое усиление клеточной токсичности в данном случае, согласно литературным данным, может быть обусловлено способностью олеиновой кислоты увеличивать продукцию АТФ и одновременно расширять митохондрии [55].

Таким образом, изучена агрегация Alg в смешанной системе VR–Alg в водной среде. Благодаря электростатическим взаимодействиям между виологеновыми группами VR и ацетатными группами Alg самопроизвольно формируются функциональные наночастицы без использования органических растворителей, температурного и ультразвукового воздействия. Размер и свойства данных частиц зависят от соотношения компонентов в системе, прежде всего, от соотношения их зарядов. Полученные наночастицы способны инкапсулировать липофильные биологически активные вещества и значительно улучшать их растворимость в воде и, как следствие, биодоступность. Возможность регулировать физико-химические свойства агрегатов на основе VR–Alg, контролируя соотношение компонентов, предлагает путь к рациональному получению биосовместимых композиций, способных повысить растворимость липофильных биологически активных веществ в водных растворах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подробности синтеза VR описаны в работе [47]. Альгинат натрия (Acros Organics), кверцетин (95%, Acros Organics) и олеиновую кислоту (99%,

Таблица 1. Цитотоксичность индивидуальных растворов Alg, кверцетина и олеиновой кислоты, эквимольной системы VR–Alg в отсутствие и в присутствии солюбилизированных субстратов кверцетина и ОК, а также значения индекса селективности (ИС)

Композиция	$IC_{50}(\text{Alg}), \text{мМ.}$		ИС
	M–HeLa	Chang liver	
Alg	>0.05	>0.05	–
Кверцетин	0.07±0.006	0.03±0.001	0.42
Олеиновая кислота	0.33±0.2	0.22±0.1	0.66
VR–Alg	0.046±0.004	0.051±0.004	1.11
VR–Alg–кверцетин	0.048±0.003	0.05±0.004	1.04
VR–Alg–олеиновая кислота	0.048±0.003	0.036±0.002	0.75

Alfa Aesar) использовали без дополнительной очистки. Растворы готовили в деионизированной воде (18.2 МΩ), 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. Смешанные растворы VR–Alg готовили простым смешиванием различных объемов исходных водных растворов полимера и макроцикла в определенном соотношении.

Для определения электропроводности использовался 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. Размеры частиц и их дзета-потенциал измеряли на анализаторе частиц Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания). Спектры поглощения измеряли в кварцевых кюветах толщиной 1 и 10 мм с помощью спектрофотометра Specord 250 Plus (Analytic Jena, Германия) при 25 °C. 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 экспериментов по цитотоксичности использовали культуру опухолевых клеток М-HeLa клон 11 (эпителиоидный рак шейки матки, сублиния HeLa, клон М-HeLa из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) и линию клеток печени человека (Chang liver) из коллекции Научно-исследовательском институте 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 кле-

точной пролиферации – МТТ-теста [56]. Клетки высевали на 96-луночный планшет фирмы Nunc в концентрации 5×10^3 клеток на лунку в объеме 100 мкл среды и культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C до образования монослоя. Затем питательную среду удаляли, и в лунки вносили по 100 мкл растворов испытуемых образцов в заданных разведениях, которые готовили непосредственно в питательной среде. Через 24 ч инкубации клеток с тестируемыми соединениями питательную среду удаляли с планшета, добавляли 100 мкл питательной среды без сыворотки с МТТ в концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали 4 ч при 37 °C. Затем в каждую лунку к кристаллам формазана добавляли по 100 мкл ДМСО. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 540 нм на планшетном-ридере Invitrologic (Россия). Значения IC₅₀ были рассчитаны с использованием онлайн-калькулятора MLA - Quest Graph™ IC50 Calculator AAT Bioquest, Inc. (AAT Bioquest Inc. Quest Graph™ IC₅₀ Calculator <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>). Эксперименты были повторены трижды, и результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. 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>

ФИНАНСОВАЯ 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/S0044460X23050153 для авторизованных пользователей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kashapov R., Gaynanova G., Gabdrakhmanov D., Kuznetsov D., Pavlov R., Petrov K., Zakharova L., Sinyashin O. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. P. 6961. doi 10.3390/ijms21186961
2. *Polymer-Surfactant Systems* / Ed. J.C.T. Kwak. New York: CRC Press, 2020. 500 p.
3. Chavanpatil M.D., Khadair A., Panyam J. // *Pharm. Res.* 2007. Vol. 24. P. 803. doi 10.1007/s11095-006-9203-2
4. Khan N., Brettmann, B. // *Polymers.* 2019. Vol. 11. P. 51. doi 10.3390/polym11010051
5. Lee K.Y., Mooney D.J. // *Prog. Polym. Sci.* 2012. Vol. 37. P. 106. doi 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
6. Gurikov P., Smirnova I. // *Gels.* 2018. Vol. 4. P. 14. doi 10.3390/gels4010014
7. Uyen N.T.T., Hamid Z.A.A., Tram N.X.T., Ahmad N. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. Vol. 153. P. 1035. doi 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.233
8. Massana Roquero D., Bollella P., Katz E., Melman A. // *ACS Appl. Polym. Mater.* 2021. Vol. 3. P. 1499. doi 10.1021/acsapm.0c01358
9. Abasalizadeh F., Moghaddam S.V., Alizadeh E., Akbari E., Kashani E., Fazljou S.M.B., Torbati M., Akbarzadeh A. // *J. Biol. Eng.* 2020. Vol. 14. P. 17. doi 10.1186/s13036-020-00239-0
10. Sabater I Serra R., Molina-Mateo J., Torregrosa-Cabanilles C., Andrio-Balado A., Dueñas J.M.M., Serrano-Aroca Á. // *Polymers.* 2020. Vol. 12. P. 702. doi 10.3390/polym12030702
11. Straccia M.C., D'Ayala G.G., Romano I., Laurienzo P. // *Carbohydr. Polym.* 2015. Vol. 125. P. 103. doi 10.1016/j.carbpol.2015.03.010
12. Li S., Wang X., Chen J., Guo J., Yuan M., Wan G., Yan C., Li W., Machens H.G., Rinkevich Y., Yang X., Song H., Chen Z. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. Vol. 202. P. 657. doi 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.080
13. Pasparakis G., Bouropoulos N. // *Int. J. Pharm.* 2006. Vol. 323. P. 34. doi 10.1016/j.ijpharm.2006.05.054
14. Kerschenmeyer A., Arlov Ø., Malheiro V., Steinwachs M., Rottmar M., Maniura-Weber K., Palazzolo G., Zenobi Wong M. // *Biomater. Sci.* 2017. Vol. 5. P. 1756. doi 10.1039/c7bm00341b
15. Dang W., Wang Y., Chen W.C., Ju E., Mintz R.L., Teng Y., Zhu L., Wang K., Lv S., Chan H.F., Tao Y., Li M. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2023. Vol. 15. P. 4911. doi 10.1021/acsami.2c18494
16. *Biopolymer Membranes and Films* / Eds M.A. de Moraes, C.F. da Silva, R.S. Vieira. New York: Elsevier, 2020. P. 273.
17. Eroğlu M., Kurşaklıoğlu H., Misirli Y., Iyisoy A., Acar A., Işin Doğan A., Denkba E.B. // *J. Microencapsul.* 2006. Vol. 23. P. 367. doi 10.1080/02652040500286318
18. Lawrie G., Keen I., Drew B., Chandler-Temple A., Rintoul L., Fredericks P., Grøndahl L. // *Biomacromolecules.* 2007. Vol. 8. P. 2533. doi 10.1021/bm070014y
19. Yoncheva K., Tzankov B., Yordanov Y., Spassova I., Kovacheva D., Frosini M., Valoti M., Tzankova V. // *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 2020. Vol. 59. P. 101870. doi 10.1016/j.jddst.2020.101870
20. Azumah J., Smistad G., Hiorth M. // *Colloids Surf. (A).* 2022. Vol. 653. P. 129924. doi 10.1016/j.colsurfa.2022.129924
21. Prabha G., Raj V. // *Mater. Sci. Eng. (C).* 2017. Vol. 79. P. 410. doi 10.1016/j.msec.2017.04.075
22. Maity S., Mukhopadhyay P., Kundu P.P., Chakraborti A.S. // *Carbohydr. Polym.* 2017. Vol. 170. P.124. doi 10.1016/j.carbpol.2017.04.066
23. Khan M.A., Yue C., Fang Z., Hu S., Cheng H., Bakry A.M., Liang L. // *J. Food Eng.* 2019. Vol. 258. P. 45. doi 10.1016/j.jfoodeng.2019.04.010
24. Ayaz F., Alas M.O., Genc R. // *Inflammation.* 2020. Vol. 43. P. 777. doi 10.1007/s10753-019-01165-0
25. Guzmán E., Llamas S., Maestro A., Fernández-Peña L., Akanno A., Miller R., Ortega F., Rubio R.G. // *Adv. Colloid. Interface Sci.* 2016. Vol. 233. P. 38. doi: 10.1016/j.cis.2015.11.001
26. Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solutions.* Chichester: Wiley, 2002. 545 p.
27. Mirtič J., Paudel A., Laggner P., Hudoklin S., Kreft M.E., Kristl J. // *Int. J. Pharm.* 2020. Vol. 580. P. 119199. doi 10.1016/j.ijpharm.2020.119199
28. Somasundaran P., Chakraborty S., Qiang Q., Deo P., Wang J., Zhang R. // *Int. J. Cosmet. Sci.* 2005. Vol. 27. P. 135. doi 10.1111/j.1467-2494.2005.00257_2.x
29. Llamas S., Guzmán E., Ortega F., Baghdadli N., Cazeneuve C., Rubio R.G., Luengo G.S. // *Adv. Colloid. Interface Sci.* 2015. Vol. 222. P. 461.
30. Zhao L., Wang J., Zhang X., Guo X., Chen L., Zhang A., Cao K., Li J. // *J. Pet. Explor. Prod. Technol.* 2022. Vol. 13. P. 853. doi 10.1007/s13202-022-01564-4

31. Wu Q., Ding L., Zhang L., Ge J., Rahman M.A., Economou I.G., Guérillot D. // *Energy*. 2023. Vol. 264. P. 126256. doi 10.1016/j.energy.2022.126256
32. Kralova I., Sjöblom J. // *J. Dispers. Sci. Technol.* 2009. Vol. 30. P. 1363. doi 10.1080/01932690902735561
33. Handbook of Nutraceuticals and Natural Products: Biological, Medicinal, and Nutritional Properties and Applications / Eds P. Balakrishnan, S. Gopi. Hoboken: Wiley, 2022. P. 363.
34. Mirtič J., Ilaš J., Kristl J. // *Carbohydr. Polym.* 2018. Vol. 181. P. 93. doi 10.1016/j.carbpol.2017.10.040
35. Yang J., Chen S., Fang Y. // *Carbohydr. Polym.* 2009. Vol. 75. P. 333. doi 10.1016/j.carbpol.2008.07.037
36. Degen P., Paulus M., Zwar E., Jakobi V., Dogan S., Tolan M., Rehage H. // *Surf. Interface. Anal.* 2019. Vol. 51. P. 1051. doi 10.1002/sia.6691
37. Neumann M.G., Schmitt C.C., Iamazaki E.T. // *Carbohydr. Res.* 2003. Vol. 338. P. 1109. doi 10.1016/S0008-6215(03)00051-X
38. Hoque M.A., Mahbub S., Khan M.A., Eldesoky G.E. // *J. Dispers. Sci. Technol.* 2022. Vol. 43. P. 1039. doi 10.1080/01932691.2020.1847661
39. Morozova J.E., Myaldzina C.R., Voloshina A.D., Lyubina A.P., Amerhanova S.K., Syakaev V.V., Ziganshina A.Yu., Antipin I.S. // *Colloids Surf. (A)*. 2022. Vol. 642. P. 128622. doi 10.1016/j.colsurfa.2022.128622
40. Mirtič J., Kogej K., Baumgartner S., Smistad G., Kristl J., Hiorth M. // *Int. J. Pharm.* 2016. Vol. 511. P. 774. doi 10.1016/j.ijpharm.2016.07.065
41. Ahmady A.R., Solouk A., Saber-Samandari S., Akbari S., Ghanbari H., Brycki B.E. // *J. Colloid. Interface. Sci.* 2023. Vol. 638. P. 616. doi 10.1016/j.jcis.2023.01.139
42. Zhao G., Cao K., Xu C., Sun A., Lu W., Zheng Y., Li H., Hong G.L., Wu B., Qiu Q.M., Lu Z. // *Int. J. Biol. Sci.* 2017. Vol. 13. P. 888. doi 10.7150/ijbs.18468
43. Liu A.-R., Lv Z., Yan Z.-W., Wu X.-Y., Yan L.-R., Sun L.-P., Yuan Y., Xu Q. // *J. Transl. Med.* 2023. Vol. 21. P. 27. doi 10.1186/s12967-023-03878-1
44. Yu X., Yang Y., Chen T., Wang Y., Guo T., Liu Y., Li H., Yang L. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2023. Vol. 11. P. 1075917. doi 10.3389/fcell.2023.1075917
45. Carvalho C., Moreira P.I. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2023. Vol. 79. P. 102694. doi 10.1016/j.conb.2023.102694
46. Hazra R., Novelli E.M., Hu X. // *CNS Neurosci. Ther.* 2023. Vol. 29. P. 783. doi 10.1111/cns.14068
47. 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
48. Kashapova N.E., Kashapov R.R., Ziganshina A.Y., Nikitin D.O., Semina I.I., Salnikov V.V., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R.I., Zakharova L.Y. // *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15. P. 921. doi 10.3390/pharmaceutics15030921
49. Kashapov R., Razuvayeva Y., Ziganshina A., Lyubina A., Amerhanova S., Sapunova A., Voloshina A., Nizameev I., Salnikov V., Zakharova L. // *Colloids Surf. (A)*. 2022. Vol. 648. P. 129330. doi 10.1016/j.colsurfa.2022.129330
50. Pescatori L., Arduini A., Pochini A., Secchi A., Massera C., Ugozzoli F. // *Org. Biomol. Chem.* 2009. Vol. 7. P. 3698. doi 10.1039/B906409E
51. Lv Z.-P., Chen B., Wang H.-Y., Wu Y., Zuo J.-L. // *Small*. 2015. Vol. 11. P. 3597. doi 10.1002/sml.201500090
52. Wang K., Guo D.-S., Wang X., Liu Y. // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5. P. 2880. doi 10.1021/nn1034873
53. Chen Y.-B., Zhang Y.-B., Wang Y.-L., Kaur P., Yang B.-G., Zhu Y., Ye L., Cui Y.L. // *J. Nanobiotechnol.* 2022. Vol. 20. P. 272. doi 10.1186/s12951-022-01452-3
54. Qi Y., Jiang M., Cui Y.L., Zhao L., Zhou X. // *Nanoscale Res. Lett.* 2015. Vol. 10. P. 408. doi 10.1186/s11671-015-1117-7
55. Park E.-J., Lee A.Y., Chang S.-H., Yu K.-N., Kim J.-H., Cho M.-H. // *Toxicol. Lett.* 2014. Vol. 224. P. 114. doi 10.1016/j.toxlet.2013.09.018
56. 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. Biodiversity*. 2022. Vol. 19. P. e202100970. doi 10.1002/cbdv.202100970

Supramolecular Systems Based on Sodium Alginate and Viologen Calyx[4]resorcinol for Encapsulation of Hydrophobic Compounds

R. R. Kashapov^{a,*}, Yu. S. Razuvaeva^a, A. Yu. Ziganshina^a, A. S. Sapunova^a,
A. D. Voloshina^a, V. V. Salnikov^b, and 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 14, 2023; revised April 14, 2023; accepted April 17, 2023

The work is devoted to the study of a supramolecular system based on viologen calix[4]resorcinol and sodium alginate in an aqueous medium using a set of physicochemical methods. It was established that sodium alginate and viologen calix[4]resorcinol form stable nanoparticles capable of encapsulating hydrophobic biologically active substances in the range of macrocycle:polymer concentration ratios from 1:2 to 1:10. The study of the cytotoxic properties of these nanoparticles in the presence of encapsulated substrates showed an increase in the selectivity of the action of quercetin and oleic acid against M-HeLa tumor cells by 2.47 and 1.14 times, respectively.

Keywords: calixarene, polymer, self-assembly, complexation, solubilization, cytotoxicity