

УДК 543.645.9

НАНОКАПСУЛА НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОГО МИНЕРАЛА КЛИНОПТИЛОЛИТА С ОБОЛОЧКОЙ ИЗ ЛЕЦИТИНА

© 2020 г. А.Г. Погорелов*, Т.А. Степанова*, А.И. Панаит*, В.А. Балашов*, А.А. Гулин**, ***, В.Н. Погорелова*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

**Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
119334, Москва, ул. Косыгина, 4

***Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Ленинские горы, 1/3
E-mail: agpogorelov@rambler.ru

Поступила в редакцию 22.01.2020 г.

После доработки 19.05.2020 г.

Принята к публикации 04.06.2020 г.

Разработана технология получения в лабораторных условиях наночастиц природного клиноптилолита — минерала из семейства цеолитов. Размер цеолитовых частиц определяли методом сканирующей электронной микроскопии, а нанокapsул — посредством динамического рассеяния света. Предложена методика нанесения на поверхность наночастицы слоя спирторастворимого фосфатидилхолина (лецитина). Адсорбцию лецитина частицами клиноптилолита изучали методом ультрафиолетовой спектроскопии. Показано, что образование комплекса фосфолипида и цеолита в этиловом спирте имеет сложную кинетику, причем в начальной фазе регистрируется адсорбция лецитина с последующей его десорбцией в растворитель.

Ключевые слова: нанокapsула, фосфатидилхолин (лецитин), клиноптилолит (цеолит), УФ-спектроскопия, сканирующая электронная микроскопия, динамическое рассеяние света.

DOI: 10.31857/S000630292005004X

Наиболее естественным способом введения в организм нерастворимых в воде соединений является их потребление через желудочно-кишечный тракт. Данный прием особенно предпочтителен в случае необходимости непосредственной доставки веществ в область гастроэнтерального эпителия [1]. Однако ожидаемый эффект может быть менее значимым, что обусловлено действием ферментов (пептидазы, протеазы, амилазы, липазы, нуклеазы) и кислотности (рН ~ 2÷8). Чтобы сохранить специфическую активность в условиях агрессивной среды желудка и просвета кишечника, вводимые вещества преобразуют в коллоид или суспензию наночастиц [2–6].

В качестве перспективных материалов при создании капсулы, которая может служить платформой для наноконтнера, рассматривают неорганические вещества [7–9]. В их ряду находятся цеолиты — алюмосиликаты, которые применяются в пищевом производстве и в агротехнологиях [10–12]. Из семейства природных цеоли-

тов в биомедицинских целях наиболее широко используют клиноптилолит [13]. Пористая структура значительно увеличивает площадь внешней поверхности частиц данного цеолита, доступной для адсорбции. Показан ряд положительных качеств этого минерала — действие его как антиоксиданта [14], противоракового агента [15] или детоксиканта [16]. Отработан метод получения синтетических наночастиц цеолита в лабораторных условиях [17–22], но их производство ограничено малыми объемами, стоимостью конечного продукта и необходимостью его очистки от исходных ингредиентов, участвующих в реакции. Альтернативой синтетическому продукту может быть природный цеолит, который добывают в промышленных масштабах [12, 23].

Поверхность наночастицы модифицируют с тем, чтобы обеспечить биосовместимость наносистемы из твердого неорганического материала [24–26] или нерастворимого в воде плотного вещества [27, 28] с мишенью. В случае слизистого эпителия предъявляют требование средства наночастицы и мукусового слоя, что способствует

Сокращение: К/Ц — клиноптилолит/лецитиновый.

ее закреплению на его поверхности. Мукоадгезивность обеспечивает покрытие частицы фосфолипидом [29, 30], в частности фосфатидилхолином – основным компонентом клеточной мембраны. Фосфолипидное покрытие также выполняет функцию поверхностно активного вещества, что стабилизирует суспензию. Поэтому капсулу, состоящую из цеолита (ядро) и фосфолипида (оболочка), рассматривают в качестве многофункциональной платформы для последующего создания специализированного наноконтейнера.

Примером успешного использования алюмосиликата может быть исследование, в котором изучали кристалл синтетического цеолита как основу транспортера для доставки нуклеиновых кислот и органических молекул [24]. В цитируемой работе применили покрытие из поли-L-лизина, что сделало более эффективным транспорт наночастицы в культивируемую HeLa-клетку. Однако обзор доступной литературы показывает отсутствие работ по созданию наноплатформы на основе природного цеолита. Кроме того, нет данных о том, как поведет себя фосфолипид при взаимодействии с наночастицами этого минерала. Таким образом, цель данной работы состояла в том, чтобы разработать методику получения наноразмерных частиц природного клиноптилолита и изучить сорбцию фосфатидилхолина полученными частицами.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Предподготовка клиноптилолита. В работе использовали коммерческий препарат «Литовит М» (НПФ «Новь», Новосибирск), который произведен из природного минерала, добытого на Холинском месторождении (Бурятия). Каскадная механическая активация позволяет промышленным способом очистить природный цеолит от примесей и получить образец со 100%-м содержанием активного компонента – клиноптилолита. На начальном этапе подготовки исходный препарат тщательно растирали в фарфоровой ступке при комнатной температуре. В результате получали пудру клиноптилолита, состоящую из частиц микронного размера.

Сканирующая электронная микроскопия. Образцы визуализировали посредством сканирующей электронной микроскопии. Для этого суспензию частиц клиноптилолита в дистиллированной воде (30 мг/100 мл) обрабатывали предварительно ультразвуком в течение 40 с. Каплю суспензии (~2 мкл) наносили на поверхность держателя образцов электронного микроскопа. Затем воду испаряли при комнатной температуре в струе чистого воздуха, после чего на поверхность образца наносили слой платины. Металл распыляли в среде аргоновой плазмы, ис-

пользуя установку JFC-1600 (JEOL, Япония). Условия режима напыления были подобраны эмпирически, но, в соответствии с калибровочной кривой, которая прилагается к руководству по эксплуатации прибора, при заданных параметрах напыления формируется пленка толщиной 10 нм. Пленка тяжелого металла на поверхности препарата значительно усиливает сигнал вторичных электронов, снимает электростатический заряд и предохраняет образец от нагрева, который может служить причиной его механического разрушения. Тонкую структуру рельефа объекта изучали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6390A (JEOL, Япония), при ускоряющем напряжении 25 кВ в режиме вторичных электронов.

Экстракция фосфатидилхолина. Для получения экстракта фосфатидилхолина использовали пищевую добавку E322 марки «ADLEC» (Lecigran 1000P, производитель – Cargill, Германия), которая представляет собой смесь полярных фосфолипидов. Навеску препарата (600 мг) тщательно размешивали в 6 мл этилового спирта до состояния однородной суспензии. Экстракцию лецитина проводили в этиловом спирте при комнатной температуре в течение суток, после чего нерастворенный компонент отделяли центрифугированием при 600 g в течение 10 мин. Полученный маточный экстракт отбирали в чистую стеклянную герметичную пробирку, которую хранили при 4°C в темноте. Для экспериментов использовали рабочий раствор, который представляет собой маточный экстракт, разбавленный в 30 раз этиловым спиртом.

УФ-спектрометрия. В ультрафиолетовой области спектра поглощения фосфатидилхолина регистрируют три максимума: 200–210, 235 и 280 нм. Для измерений мы использовали пик поглощения карбонильными группами на длине волны 235 нм. Выбор был обусловлен нестабильностью сигнала на длине волны 200–210 нм, а также относительно низким уровнем пика на 280 нм. Оптическая плотность рабочего раствора лецитина на характерной длине волны (235 нм) составляет 0.76 единицы, что соответствует оптимальным условиям для аналитических измерений на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наноядро из природного клиноптилолита. В результате предварительной подготовки препарата «Литовит М» получили образец, состоящий из частиц микронного размера. В основу дальнейшей процедуры положена низкотемпературная обработка, для чего порошок микронных частиц клиноптилолита тщательно растирали в агатовой ступке при температуре –35°C. Схематично по-

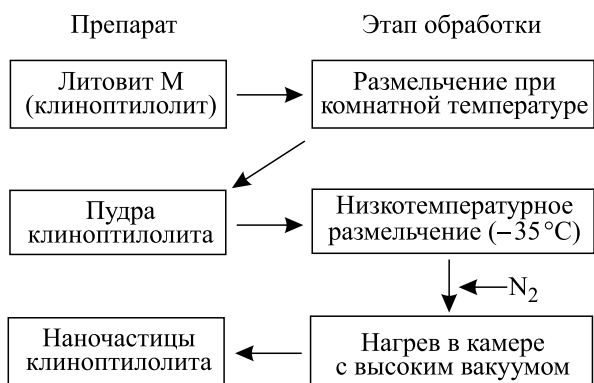


Рис. 1. Последовательность получения наноразмерных частиц клиноптилолита. В эксперименте использовали коммерческий препарат «Литовит М» (НПФ «Новь», Новосибирск), который произвели из природного минерала, добытого на Холинском месторождении (Бурятия).

следовательность получения наноразмерных частиц клиноптилолита приведена на рис. 1.

Полученную при низкой температуре пудру переносили в парах жидкого азота в вакуумную камеру, где образец постепенно нагревали до

комнатной температуры. Такой прием позволяет исключить конденсацию на поверхность холодного образца микрокапель воды из атмосферы, что вызывает агрегацию наночастиц. Частицы клиноптилолита визуализировали методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 2).

На рис. 2 приведены микрофотографии, демонстрирующие внешний вид препарата клиноптилолита на разных этапах предложенной технологии. Видно, что предобработка исходного препарата (рис. 2а) дает частицы микронного размера (рис. 2б). После низкотемпературной обработки следует избегать контакта холодного образца с комнатной атмосферой, что вызывает агрегацию наночастиц в субмикронные кластеры (рис. 2в). При условии выполнения данного требования получаем готовый препарат частиц, размер которых визуально можно оценить в несколько десятков нанометров (рис. 2г). Указанная величина соответствует размеру синтетического нанокристалла L-цеолита, что показано методом просвечивающей электронной микроскопии [24].

Клиноптилолит/лецитиновый комплекс. Исходно был определен интервал времени, необходи-

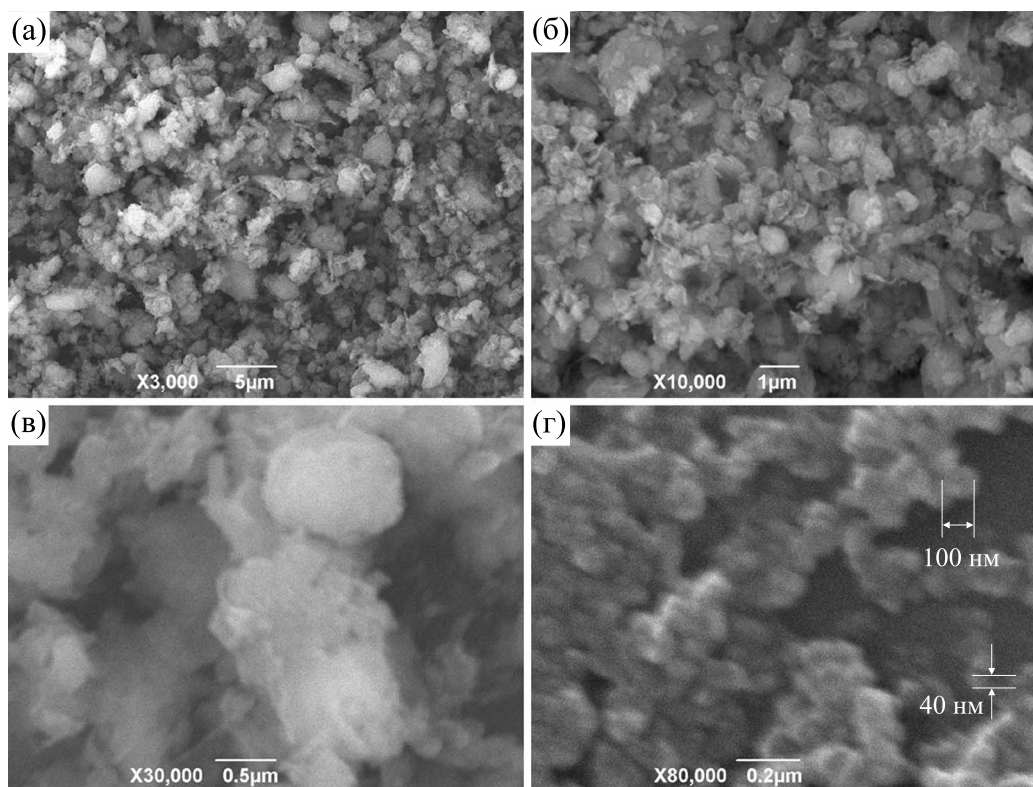


Рис. 2. Микрофотографии частиц клиноптилолита: (а) — исходный препарат «Литовит М»; (б) — порошок, полученный после размолла препарата в фарфоровой ступке при комнатной температуре; (в) — микронные агрегаты наночастиц, которые образуются после контакта пудры холодного препарата с атмосферными парами воды; (г) — наноразмерные частицы, полученные после размельчения пудры в агатовой ступке при низкой температуре (-35°C) с последующим плавным нагреванием препарата до комнатной температуры в вакууме.

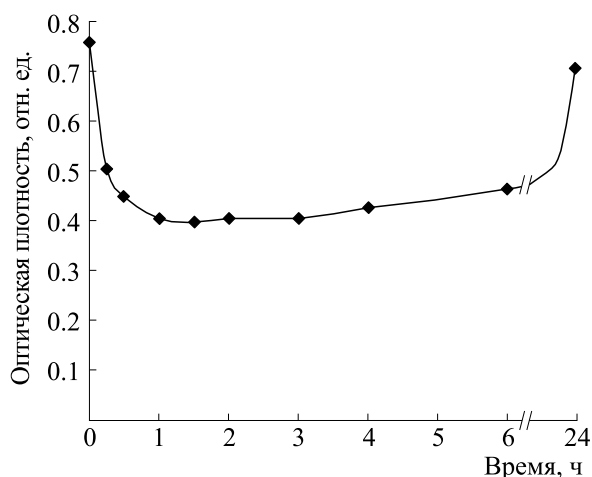


Рис. 3. Изменение со временем оптической плотности на длине волны 235 нм в спектре поглощения рабочего раствора лецитина в этиловом спирте при инкубации в нем наночастиц клиноптилолита.

мый для завершения связывания лецитина клиноптилолитовым ядром. Исследование проводили следующим образом. Порцию наночастиц клиноптилолита (20 мг) инкубировали при комнатной температуре в течение разного временного интервала (1/4 ч, 1/2 ч, 1 ч, 1.5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч или 6 ч) в 4 мл рабочего раствора лецитина, перемешивая горизонтальным встряхиванием. Полученную суспензию центрифугировали при 600 g в течение 10 мин. Затем в кварцевую кювету отбирали 3 мл надосадочной жидкости, которую исследовали методом УФ-спектрометрии. Связывание лецитина сопровождается уменьшением его содержания в растворе, чему соответствует снижение оптической плотности на длине волны 235 нм. На рис. 3 показана кривая изменения величины данного параметра со временем при инкубации наночастиц клиноптилолита в рабочем растворе лецитина.

Кинетика сорбции лецитина имеет сложный характер (рис. 3). В интервале 1.5 ч оптическая плотность достигает минимального значения (~0.4), что означает максимальный уровень связывания фосфатидилхолина. Образование клиноптилолит/лецитинового (К/Ц) комплекса реализуется через адсорбцию, так как размер (~0,2 нм) пор цеолита не позволяет молекулам фосфолипида диффундировать внутрь частицы. Отметим, что адсорбция обратима, так как со временем оптическая плотность раствора восстанавливается до начального уровня (рис. 3). Данный факт свидетельствует о десорбции лецитина с поверхности клиноптилолитового ядра. Неустойчивость К/Ц-комплекса, возможно, обусловлена двумя разнонаправленными процессами: сорбцией фосфолипида на поверхности частицы и его последующим растворением в этиловом спирте.

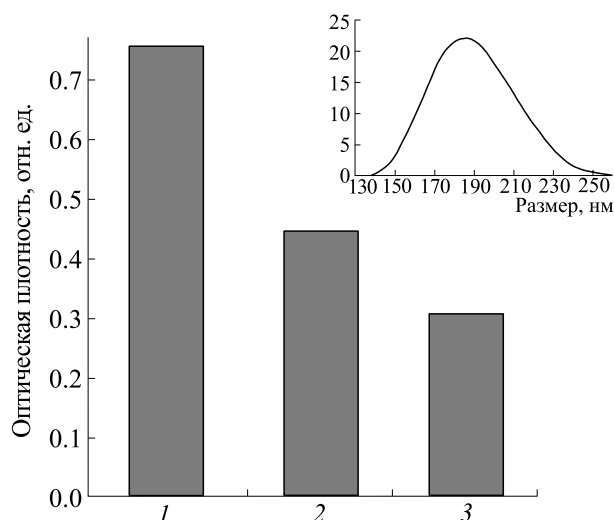


Рис. 4. Изменение оптической плотности на длине волны 235 нм в спектре поглощения раствора лецитина в этиловом спирте: 1 – исходный рабочий раствор лецитина, 2 – рабочий раствор лецитина после 1.5 ч инкубации в нем 20 мг наночастиц клиноптилолита, 3 – раствор этилового спирта после 24 ч инкубации в нем капсул клиноптилолита, покрытых лецитином. На врезке: распределение размера наночастиц с ядром из клиноптилолита и лецитиновой оболочкой, данные получены методом динамического светорассеяния.

Клиноптилолит/лецитиновая капсула. Рассматриваемая кинетика (рис. 3) достаточно медленная, с пролонгированным во времени выраженным экстремумом, что позволяет сепарировать К/Ц-комплекс. После образования комплекса (1.5 ч инкубации наночастиц в рабочем растворе) К/Ц-суспензию центрифугировали (600 g, 10 мин). Осадок переносили в 15 мл бидистиллированной воды с тем, чтобы за счет гидрофобных взаимодействий стабилизировать лецитиновую оболочку, а также отмыть несвязанный фосфатидилхолин. В результате получили водную суспензию капсул с клиноптилолитовым ядром и лецитиновым покрытием. Наличие оболочки проверяли следующим образом. Полученную суспензию центрифугировали (600 g, 10 мин), отбирали слой воды, а к осадку, содержащему К/Ц-капсулы, добавляли 3 мл этилового спирта. В течение последующих 24 ч лецитин полностью выходит в раствор (рис. 3), что оценивали по увеличению оптической плотности раствора на длине волны 235 нм (рис. 4).

На диаграмме (рис. 4) приведены сравнительные данные. Можно видеть, что формирование К/Ц-комплекса (рис. 4, 2) снижает оптическую плотность исходного рабочего раствора лецитина (рис. 4, 1). В результате добавления к осадку К/Ц-капсул этилового спирта наблюдается десорбция лецитина (рис. 4, 3), что свидетельствует о наличии оболочки. Отметим, что количество лецити-

на, потраченного на формирование К/Ц-комплекса (разница между значениями 1 и 2 на рис. 4), практически совпадает с его количеством, выделенным при растворении оболочки К/Ц-капсулы (рис. 4, 3).

Важным критерием является размер частиц конечного продукта. К сожалению, трудно разработать адекватную методику подготовки препарата для визуализации К/Ц-комплекса методом сканирующей электронной микроскопии. Препятствием служит лецитин оболочки, который разрушается в вакуумной камере прибора под пучком ускоренных электронов. Поэтому линейный размер капсулы оценивали в водной суспензии методом динамического светорассеяния. Видно (рис. 4, врезка), что исследуемый параметр варьирует в диапазоне 140–260 нм с максимумом распределения в области 190 нм. Указанная величина близка по значению размеру синтетического нанокристалла L-цеолита после нанесения на его поверхность оболочки из поли-L-лизина, что также показано методом динамического светорассеяния [24].

Сочетание наноразмера и фосфолипидного покрытия является обязательным условием успешной диффузии частицы через барьерный слой слизи энтерального эпителия [31, 32]. Указанные критерии соблюдены при создании К/Ц-капсулы, которая может служить многофункциональной платформой при создании нанотранспортера. Для этого можно использовать электростатическое взаимодействие лецитина оболочки с молекулой активного вещества или ее растворимость в фосфолипиде. Однако следует учитывать не только свойства лецитинового покрытия, но и положительные качества клиноптололитового ядра К/Ц-капсулы, например, антиоксидантную активность цеолита [14], его противовоспалительное действие [15] или ионообменные характеристики, что используют при детоксикации [16].

Завершая обсуждение результатов, можно сделать следующие выводы. В лабораторных условиях нами получены наночастицы природного клиноптололита. Предложенная процедура не требует привлечения сложных технологий и больших затрат энергии. Однако обязательным условием является низкотемпературная обработка на завершающих стадиях подготовки препарата наночастиц. Нами разработан метод формирования наноразмерной капсулы с цеолитовым ядром и оболочкой из лецитина с использованием экстракта фосфатидилхолина в этиловом спирте. Учитывая физико-химические свойства структурных элементов капсулы, данная конструкция может быть использована в качестве многофункциональной платформы при создании наноконтейнера.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работу проводили в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00845-20-00. Развитие методов визуализации микрообъектов и подходов для УФ-спектрометрии фосфолипидов выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-16-00019).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Simonoska-Crcarevska, M. Glavas Dodov, and K. Goracinova, *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **68**, 565 (2008).
2. D. Render, T. Samuel, H. King, et al., *J. Nanomaterials* **2016**, 1 (2016).
3. E. Allemann, J.-C. Leroux, and R. Gurny, *Adv. Drug Delivery Rev.* **34**, 171 (1998).
4. Y. Hu, X. Jiang, Y. Ding, et al., *Biomaterials* **23**, 3193 (2002).
5. A. Jintapattanakit, V.B. Junyaprasert, S. Maob, et al., *Int. J. Pharmaceutics* **342**, 240 (2007).
6. J. Zhu and R.C. Hayward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 2113 (2008).
7. X. Yu, A. Khalil, P.N. Dang, et al., *Adv. Funct. Mater.* **24**, 3082 (2014).
8. S. Kar, *J. Biotechnol. Biomater.* **6**, 3 (2016).
9. A. Stefanache, M. Ignat, C.A. Peptu, et al., *Appl. Sci.* **7**, 237 (2017).
10. D. Kojića, S. Pajevića, J. A. Jovanović-Galovića, et al., *J. Soil Sci. and Plant Nutrition* **12**, 113 (2012).
11. R.Y. Yada, N. Buck, R. Canady, et al., *Food Science and Food Safety* **13**, 730 (2014).
12. K. Bohacs, J. Faitli, L. Bokanyi, and G. Mucsi, *Metall. Mater.* **62** (2B), 1399 (2017).
13. A. Mastinu, A. Kumar, G. Maccarinelli, et al., *Molecules*, **24**, 1517 (2019).
14. P. Pellegrino, B. Mallet, S. Delliaux, et al., *Biochem. Biophys Res. Commun.* **410**, 478.
15. L. Bacakova, M. Vandrovцова, I. Kopova, and I. Jirka, *Biomaterials Sci.* **6**, 974 (2018).
16. M. M. Selim, D. M. El-Mekawi, R. M. M. Aboelenin, et al., *J. of Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences* **24**, 19 (2017).
17. E. B. G. Johnson and S. E. Arshad, *Appl. Clay Sci.* **98**, 215 (2014).
18. M. A. Severance, Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy (Graduate School of The Ohio State University, 2014).

19. Y. Tian, Thesis for the Degree of PhD (University of St. Andrews, 2014).
20. S. Mintova, J. Grand, and V. Valtchev, *Comptes Rendus Chimie* **19**, 183 (2016).
21. E. K. Tiburu, A. Salifu, E. O. Aidoo, et al., *J. Nano Res.* **48**, 156 (2016).
22. L. Tosheva, S. Belkhair, M. Gackowski, et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **157**, 254 (2017).
23. A. M. Elhassan, *Int. J. Cur. Adv. Res.* **5**, 1304 (2016).
24. A. Bertucci, H. Lülfi, D. Septiadi, et al., *Adv. Healthcare Mater.* **3**, 1812 (2014).
25. L.-L. Li, R. Zhang, L. Yin, et al., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 6121 (2012).
26. L. E. Euliss, J. A. DuPont, S. Gratton, and J. DeSimone, *Chem. Soc. Rev.* **35**, 1095 (2006).
27. A. Grenha, C. Remunan-Lopez, E. L. S. Carvalho, and B. Seijo, *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **69**, 83 (2008).
28. E. M. Shchukina and D. G. Shchukin, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **17**, 281 (2012).
29. G. Fricker, T. Kromp, A. Wendel, et al., *Pharm. Res.* **27**, 1469 (2010).
30. F. Baldassarre, C. Allegretti, D. Tessaro, et al., *Chemistry Select* **1**, 6507 (2016).
31. L. M. Ensign, R. Cone, and J. Hanes, *Adv. Drug Delivery Rev.* **64**, 557 (2012).
32. S. Kotta, A. W. Khan, K. Pramod, et al., *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 585.

A Clinoptilolite Natural Mineral-Based Nanocapsule Surrounded by a Shell Composed of Lecithin

A.G. Pogorelov*, T.A. Stepanova*, A.I. Panait*, V.A. Balashov*,
A.A. Gulin**, ***, and V.N. Pogorelova*

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

****Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia*

We propose a paper on the preparation procedure of zeolite clinoptilolite natural mineral-based nanocapsules in laboratory setting. The zeolite particle size distribution was determined in scanning electron microscopy images and the nanocapsule size distribution was measured by dynamic light scattering. The method for coating of the nanoparticle surface with alcohol soluble phosphatidylcholine (lecithin) is presented. UV spectrometry was used to study the adsorption of lecithin on clinoptilolite nanoparticles. The kinetics of clinoptilolite/lecithin complex was shown to exhibit intricate behavior, when phospholipids adsorption is followed by its gradual desorption in ethanol solution.

Keywords: nanocapsule, phosphatidylcholine (lecithin), clinoptilolite (zeolite), UV spectrometry, scanning electron microscopy, dynamic light scattering