

УДК 543.645.9

НАНОКОНСТРУКЦИЯ НА ОСНОВЕ ЯДРА ПРИРОДНОГО КЛИНОПТИЛОЛИТА И ОБОЛОЧКИ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА

© 2022 г. А. Г. Погорелов^{1,*}, А. И. Панаит¹, А. А. Гулин², А. А. Станкевич¹, В. Н. Погорелова¹, член-корреспондент РАН Г. Р. Иваницкий¹

Поступило 25.02.2022 г.
После доработки 05.04.2022 г.
Принято к публикации 08.04.2022 г.

Разработана наноконструкция посредством нанесения слоя фосфатидилхолина на поверхность частицы природного клиноптилолита. Формирование оболочки, эффективный размер которой не превышает толщины молекулярного слоя фосфолипида, подтверждено с помощью UV спектрометрии и молекулярной масс-спектрометрии. Гидродинамический диаметр готовой конструкции, определенный методом динамического рассеяния света, меньше, чем у исходного ядра. Предполагается, что такой эффект обусловлен наличием фосфолипидного покрытия, которое снижает силу сопротивления водной среды. Наноразмер полученной конструкции, ядро натурального клиноптилолита и фосфолипидная оболочка представляют сочетание полезных качеств, которые могут быть востребованы при создании многофункциональной платформы для доставки биологически активных веществ, биоимиджинга или в качестве основы биосенсора.

Ключевые слова: клиноптилолит, фосфатидилхолин, UV спектрометрия, времяпролетная спектрометрия вторичных ионов (ToF-SIMS), динамическое рассеяние света, сканирующая электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S2686738922040114

Почти 40% разрабатываемых лекарственных веществ получают в нерастворимом в воде виде, когда наиболее эффективным является способ доставки вещества через желудочно-кишечный тракт. В данном случае неорганические пористые материалы используют в качестве наноядра для транспортировки физиологически активных веществ [1–3]. С этой целью в ряду перспективных материалов рассматривают цеолит, нанокристаллы которого синтезируют в лабораторных условиях [4–7]. Альтернативой синтетическому продукту может быть природный минерал. Из семейства природных цеолитов в биомедицинских целях наиболее востребованным остается клиноптилолит [8, 9].

При разработке дизайна платформы на основе твердого материала особое внимание уделяют оболочке, для чего используют фосфолипиды, например, фосфатидилхолин (ФХ) – основной

ингредиент клеточной мембраны. Популярность ФХ обусловлена наличием полезных качеств: отсутствие токсичности, биodeградability, биосовместимость, самоорганизация структуры, амфифильность, стабилизация дисперсной системы. Предложен способ нанесения оболочки посредством взаимодействия неорганических наночастиц с водной эмульсией ФХ или его производных [1, 10]. Учитывая полезные свойства ФХ и клиноптилолита, комбинацию этих материалов можно рассматривать в качестве перспективной наноплатформы. Обзор доступной литературы показывает отсутствие работ, направленных на создание такой композиции. Поэтому цель данной работы состояла в том, чтобы оценить эффективность адсорбции ФХ ядром природного клиноптилолита и изучить свойства полученной конструкции.

Процедура формирования комплекса наночастицы клиноптилолита и ФХ описана ранее [11]. Кратко, на конечном этапе получения наноядра критическими условиями являются растирание пудры при низких температурах и последующий нагрев готового продукта до комнатной температуры в условиях высокого вакуума. Экстракт пищевой добавки E322 (Cargill Lecigran 1000P, Германия) в этиловом спирте (0.64 мг/мл) использовали в качестве источника ФХ. Слой фос-

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБУН ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: agpogorelov@rambler.ru

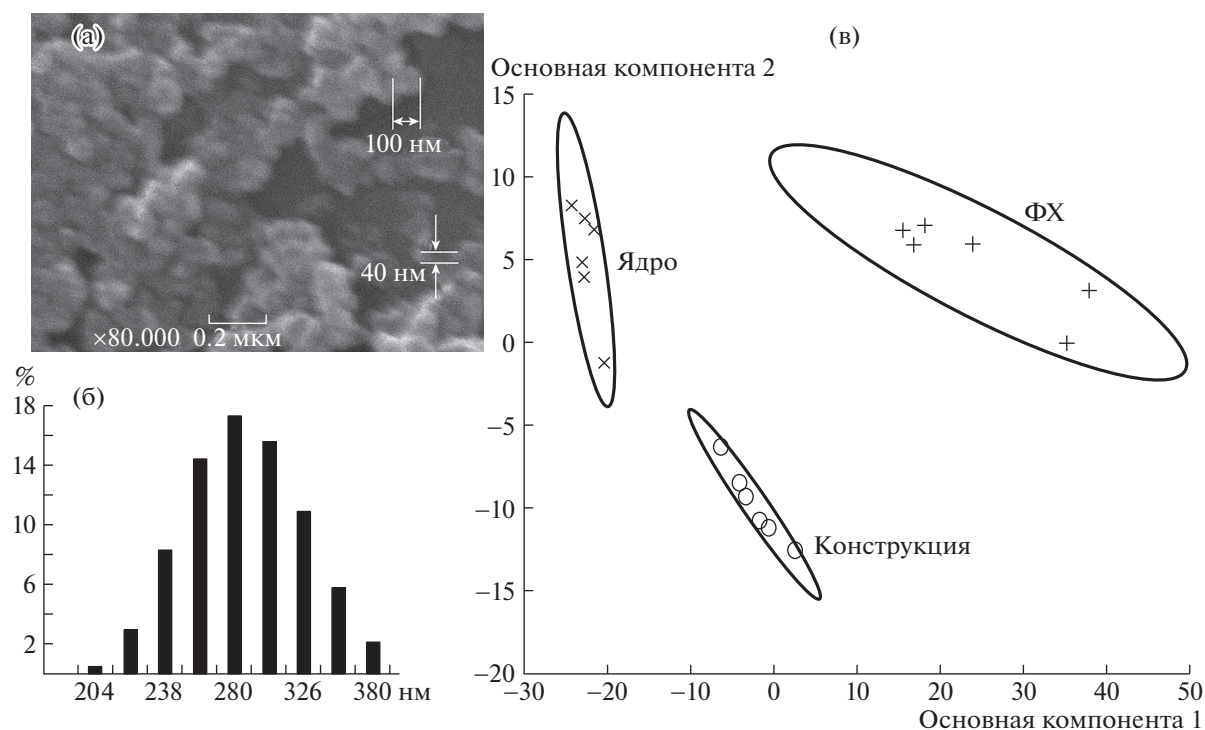


Рис. 1. (а) микрофотография наночастиц натурального клиноптилолита, изображение получено методом сканирующей электронной микроскопии (режим вторичных электронов), (б) гистограмма значений гидродинамического диаметра для наночастиц клиноптилолита, (в) сравнение методом РСА масс-спектров фосфатидилхолина (ФХ), образцов наночастиц клиноптилолита (ядро) и готовой наноконструкции (конструкция). Очерчены данные с доверительным интервалом 95% для 6 измерений в каждой группе.

фолипида на ядра наносили посредством инкубации наночастиц клиноптилолита в спиртовом экстракте ФХ. После центрифугирования полученной суспензии отбирали супернатант, а к осадку добавляли дистиллированную воду с тем, чтобы отмыть этанол и не связанный ФХ, а также стабилизировать наноконструкцию. Для изучения свойств полученного нанопродукта использовали сканирующую электронную микроскопию (SEM), метод динамического рассеяния света, времяпролетную масс-спектрометрию вторичных ионов (ToF-SIMS), UV – спектрометрию раствора ФХ в этаноле.

Качественный анализ адсорбции ФХ

Используемый фосфолипид представляет собой нейтральный диэлектролит, поэтому формирование оболочки наноядра возможно за счет взаимодействия ФХ и фиксированных зарядов на поверхности частиц клиноптилолита. Размер исходного ядра составляет десятки нанометров (рис. 1а), а его гидродинамический диаметр варьирует в диапазоне 200–410 нм (рис. 1б). Различие в указанных величинах может означать то, что свойства поверхности частиц клиноптилолита не соответствуют модели гладкой сферической частицы, которую применяют для оценки результатов метода динамического рассеяния света.

Наличие оболочки на поверхности ядра анализировали посредством метода ToF-SIMS [12], который используют для анализа органической пленки, толщиной нескольких молекулярных слоев [13]. Сравнивали препараты экстракта ФХ, наночастиц клиноптилолита без оболочки или наночастиц, обработанных экстрактом ФХ. Значимость различий между масс-спектрами оценивали в программе NB Toolbox посредством метода РСА (principal component analysis) [14]. Видно (рис. 1в), что области данных ToF-SIMS не перекрываются, что свидетельствует о значимом различии в молекулярном составе сравниваемых образцов. Результаты масс-спектрометрии однородных по составу образцов фосфолипида и наночастиц клиноптилолита находятся в разных полуплоскостях горизонтальной оси. При этом область данных полученной наноконструкции занимает промежуточное положение, что свидетельствует о модификации поверхности наноядра в результате адсорбции на его поверхность ФХ. Различие между масс-спектрами фосфолипида и конструкции отражает то, что толщина оболочки меньше глубины проникновения пучка первичных ионов. В этом случае одновременно ионизируются ядро и материал покрытия. С учетом поперечного разрешения метода ToF-SIMS этот ре-

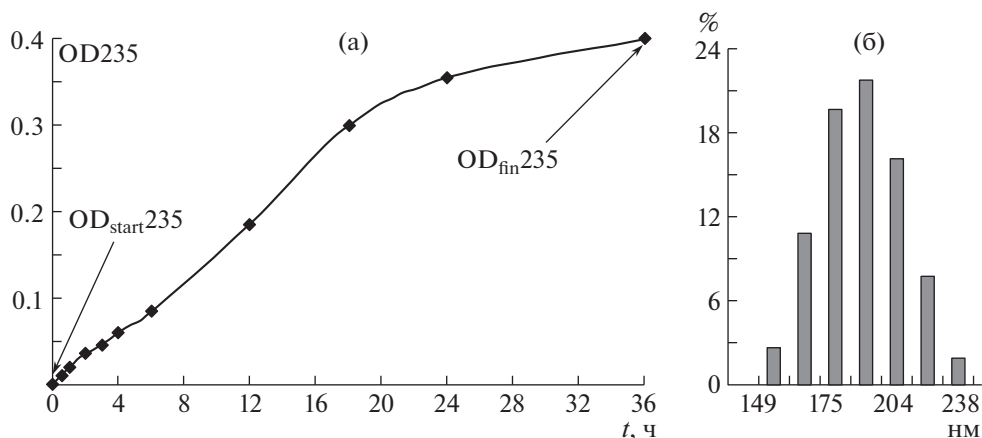


Рис. 2. (а) Изменение со временем оптической плотности на длине волны 235 нм характерного спектра поглощения этилового спирта при растворении в нем оболочки ФХ, покрывающей ядро клиноптилолита, (б) гистограмма значений гидродинамического диаметра для частиц наноконструкции, содержащей ядро натурального клиноптилолита и оболочку фосфатидилхолина. Обозначения: D_{start}^{235} – оптическая плотность этилового спирта, D_{fin}^{235} – оптическая плотность этилового спирта после растворения в нем оболочки наноконструкции.

зультат позволяет оценить толщину оболочки величиной, не превышающей нескольких нанометров.

Анализ эффективности адсорбции ФХ

Перенос готовой конструкции обратно в этиловый спирт приводит со временем к растворению оболочки, что сопровождается увеличением оптической плотности на длине волны 235 нм (OD 235) характерного спектра поглощения раствора ФХ в этаноле (рис. 2а).

Используя результаты UV спектрометрии (рис. 2а), можно определить эффективность адсорбции ФХ частицами клиноптилолита (параметр “ η ”), т.е. количество адсорбированного фосфолипида на единицу веса клиноптилолита, что определяют из выражения (1)

$$\eta = K(OD_{fin}^{235})V/M_{core}, \tag{1}$$

где K – эмпирический коэффициент пропорциональности для калибровочной прямой зависимости между концентрацией растворенного ФХ и оптической плотностью раствора; OD_{fin}^{235} – оптическая плотность спиртового раствора после растворения в нем оболочки ФХ; V – объем этилового спирта, в котором происходит десорбция оболочки; M_{core} – вес исходной порции частиц клиноптилолита, которую брали для формирования наноконструкции.

При заданных величинах ($K = 0.8$ мг/мл, $OD_{fin}^{235} = 0.4$, $V = 4$ мл, $M_{core} = 20$ мг) в выражении (1) параметр η принимает значение 0.062. Если принять допущение о сферической форме ядра и о равномерном распределении адсорбированного материала на поверхности ядра, то толщину слоя ФХ можно оценить из выражения (2)

$$\Delta = \eta r(\rho_{core}/3\rho_{shell}), \tag{2}$$

где: Δ – толщина оболочки конструкции, r – эффективный радиус ядра, ρ_{core} и ρ_{shell} – плотность материала ядра и оболочки соответственно.

Подставляя в выражение (2) известные значения параметров ($\eta = 0.062$, $r = 70$ нм, $\rho_{core} = 2$ г/см³, $\rho_{shell} = 1.16$ г/см³), рассчитываем толщину оболочки, которая оценивается величиной ~2.5 нм, что соответствует толщине одного слоя фосфолипида. Такой расчет согласуется с прогнозом, полученным на основе данных метода ToF-SIMS.

Гидродинамические свойства наноконструкции

Гидродинамический диаметр полученной наноконструкции варьирует в диапазоне 150–240 нм с максимумом в области 190 нм (рис. 2б). Отметим, гидродинамический диаметр всей конструкции заметно меньше аналогичной характеристики для ядра с максимумом в области 280 нм (рис. 1б). Другими словами, наличие оболочки ФХ вызвало уменьшение гидродинамического размера конструкции, что можно ошибочно интерпретировать как уменьшение реального размера частицы. Данный эффект, по-видимому, обусловлен снижением сопротивления водной среды для готовой конструкции с фосфолипидным покрытием по сравнению с исходным клиноптилолитовым ядром, обладающим шероховатой поверхностью. Теоретические аспекты влияние оболочки на подвижность наночастицы рассматривают в обзор [15].

Таким образом, в данном исследовании посредством нескольких аналитических методов подтверждено формирование оболочки фосфатидилхолина на поверхности наночастицы клиноптилолита. Наноразмер полученной конструкции, ядро натурального клиноптилолита и фосфоли-

пидная оболочка представляют привлекательное сочетание полезных качеств, которые могут быть востребованы при создании многофункциональной платформы, например, для доставки биологически активных веществ, биоимиджинга или в качестве основы биосенсора.

В завершение можно сделать следующие выводы. Получен новый вид наноконструкции на основе ядра натурального клиноптилолита с оболочкой из фосфатидилхолина. Используя результаты UV-спектрометрии, оценена толщина (~2.5 нм) оболочки, которая не превышает одного слоя фосфолипида. После нанесения оболочки фосфатидилхолина гидродинамический диаметр (190 нм) наноконструкции становится меньше гидродинамического диаметра (280 нм) исходного ядра. Полученные данные позволяют предположить то, что адсорбции фосфолипида модифицируют поверхность наночастицы клиноптилолита, уменьшая силу сопротивления окружающей водной среды.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

В части развития подходов анализа фосфолипидов посредством ToF-SIMS и UV спектрометрии исследование выполнено при поддержке Российского научно-го фонда (проект № 20-16-00019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baldassarre F., Allegretti C., Tessaro D., et al. // *Chemistry Select*. 2016. V. 1. P. 6507–6514.
2. Stefanache A., Ignat M., Peptu C.A., et al. // *Appl. Sci*. 2017. V. 7. P. 237–250.
3. Yu X., Khalil A., Dang P.N., et al. // *Adv. Funct. Mater*. 2014. V. 24. P. 3082–3093.
4. Johnson E.B.G., Arshad S.E. // *Appl. Clay Sci*. 2014. V. 98. P. 215–221.
5. Mintova S., Grand J., Valchev V. // *CR Chimie*. 2016. V. 19. P. 183–191.
6. Tosheva L., Belkhair S., Gackowski M., et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017. V. 157. P. 254–260.
7. Bertucci A., Lülfi H., Septiadi D., et al. // *Adv. Healthcare Mater*. 2014. V. 3. P. 1812–1817.
8. Bacakova L., Vandrovцова M., Kopova I., et al. // *Biomater. Sci*. 2018. V. 6. P. 974–989.
9. Mastinu A., Kumar A., Maccarinelli G., et al. // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 1517–1531.
10. Hellman P., Andersson L., Eriksson H. // *Cellular Immunology*. 2009. V. 258. P. 123–130.
11. Pogorelov A.G., Stepanova T.A., Panait A.I. et al. // *Biophysics*. 2020. V. 65. P. 742–746.
12. Mahoney C.M. // *Mass Spectrometry Reviews*. 2010. V. 29. P. 247–293.
<https://doi.org/10.1002/mas>
13. Bolbach G., Viari A., Galera R., et al. // *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*. 1992. V. 112. P. 93–100.
14. Graham D.J., Castner D.G. // *Biointerphases*. 2012. V. 7. P. 49–61.
15. Doane T.L., Chuang C.-H., Hill R.J., et al. // *Accounts of chemical research*. 2012. V. 45. P. 317–326.

NATURAL CLINOPTILOLITE NANO PARTICLES COATED WITH PHOSPHATIDYLCHOLINE

A. G. Pogorelov^{a, #}, A. I. Panait^a, A. A. Gulin^b, A. A. Stankevich^a,
V. N. Pogorelova^a, and Corresponding Member of the RAS G. R. Ivanitskii^a

^a *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Science,
Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation*

^b *Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: agpogorelov@rambler.ru*

A nano-carrier has been formulated by coating the phosphatidylcholine layer on the natural clinoptilolite particle surface. The shell effective size does not exceed the thickness of the phospholipid molecular layer that has been confirmed by UV spectrometry and molecular mass spectrometry. The formulated nano-carrier hydrodynamic diameter determined by dynamic light scattering is smaller than the clinoptilolite core size. This effect is assumed to be caused by the phospholipid shell, which reduces the aqueous medium friction. The nano-size of the formulated nano-carrier, the natural clinoptilolite core and the phospholipid shell together allow a combination of fruitful features that can be used for the fabrication of multifunctional platforms as the biologically active substances delivery, bioimaging or biosensors.

Keywords: clinoptilolite core, phosphatidylcholine, UV spectrometry, time of flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS), dynamic light scattering, scanning electron microscopy