

Агрегация супрамолекулярной системы на основе *N*-метил-*D*-глюкаминового каликс[4]резорцина и ЦТАБ в водной среде

Р. Р. Кашапов,^{a,b@} Ю. С. Разуваева,^{a,b} А. Ю. Зиганшина,^a Р. К. Мухитова,^a
А. С. Сапунова,^a А. Д. Волошина,^a Л. Я. Захарова^{a,b}

^aИнститут органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН, 420088 Казань, Россия

^bКазанский национальный исследовательский технологический университет, 420015 Казань, Россия

@E-mail: kashapov@iopc.ru

*Выявлена агрегация супрамолекулярной системы на основе *N*-метил-*D*-глюкаминового каликс[4]резорцина и цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) в водной среде. Оценена инкапсулирующая способность данной системы по отношению к гидрофильному субстрату родамину В. Определены антимикробные и гемолитические свойства индивидуальных и смешанной систем.*

Ключевые слова: Каликсарен, ПАВ, Судан I, солубилизация, агрегация, антимикробная активность, гемолиз.

Aggregation of Supramolecular System Based on *N*-Methyl-*D*-glucamine Calix[4]resorcinol and CTAB in Aqueous Medium

Ruslan R. Kashapov,^{a,b@} Yuliya S. Razuvayeva,^{a,b} Albina Y. Ziganshina,^a
Rezeda K. Mukhitova,^a Anastasiya S. Sapunova,^a Alexandra D. Voloshina,^a
and Lucia Ya. Zakharova^{a,b}

^aA.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, 420088 Kazan, Russian Federation

^bKazan National Research Technological University, 420015 Kazan, Russian Federation

@Corresponding author E-mail: kashapov@iopc.ru

*An aggregation of the supramolecular system based on the *N*-methyl-*D*-glucamine calix[4]resorcinol and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) in an aqueous medium was detected. The encapsulating capacity of this system relative to the hydrophilic substrate rhodamine B was evaluated. The antimicrobial and hemolytic properties of the individual and mixed systems were determined.*

Keywords: Calixarene, surfactant, Sudan I, solubilization, aggregation, antimicrobial activity, hemolysis.

В современной супрамолекулярной химии наиболее широко используемым подходом к формированию ансамблей с полезными свойствами является объединение нескольких компонент различной структуры путем их нековалентной самосборки. Реализуемые нековалентные взаимодействия позволили создать большое число систем, обладающих свойствами наноконтейнеров и нанореакторов,^[1] молекулярных устройств^[2] и т.д. В этом ключе создание супрамолекулярных амфифилов (суперамфифилов) является одним

из активно развивающихся направлений. По аналогии с традиционными амфифильными соединениями суперамфифилы содержат в своем составе гидрофильный и гидрофобный фрагменты, предорганизованные за счет нековалентного взаимодействия.^[3] Причем, в зависимости от соотношения числа гидрофобных и гидрофильных групп, также различают болаформные и геминальные суперамфифилы.^[4]

Благодаря своей природе суперамфифилы, в свою очередь, способны к самоорганизации в агрегаты суще-

ственно более сложной морфологии, чем традиционные ПАВ. В связи с этим они в последнее время нашли множество применений в построении нанотрубок,^[5] наночастиц,^[6] наноматериалов,^[7] гелей.^[8] Большое число примеров использования суперамфифилов было продемонстрировано в области создания везикул с контролируемыми свойствами,^[9] в частности везикул, стабильность которых контролируется pH среды.^[10] В качестве движущей силы при формировании данных агрегатов могут выступать водородная связь,^[11] инклюзивный механизм,^[12] координационная связь «металл-лиганд»,^[13] электростатическое взаимодействие.^[14] Таким образом, суперамфифилы обладают большим потенциалом для создания материалов с принципиально новыми свойствами, в первую очередь благодаря относительной простоте их создания. Кроме того, существенным преимуществом является контролируемая самоорганизация суперамфифилов для создания чувствительных наноконтейнеров и поверхностей, способных селективно связывать молекулы определенного типа.

Создание новых супрамолекулярных амфифилов предъявляет ряд требований к исходному синтетическому материалу. Среди основных критериев при подборе строительных блоков следует выделить следующие: биосовместимость, действие в низких дозах, низкая токсичность. В связи с этим синтез новых строительных блоков для формирования супрамолекулярных наноконтейнеров, удовлетворяющих этим требованиям, является актуальной задачей. Востребованность систем на основе поверхностно-активных веществ (ПАВ) для доставки лекарственных препаратов обусловлена тем, что значительная часть лекарств плохо растворима в воде, но легко солюбилизируется в неполярном ядре прямых мицелл. Недостатком мицеллярных наноконтейнеров является их непостоянный состав и неконтролируемый процесс высвобождения связанных соединений. При разбавлении наноконтейнеры на основе ПАВ разрушаются, что приводит к преждевременному высвобождению субстрата. Агрегаты на основе супрамолекулярных амфифилов, напротив, более стабильны в биологических водных средах, поэтому в настоящее время создаются смешанные ансамбли на основе ПАВ и макроциклов, в частности каликс[4]аренов.^[15] Поэтому в данной работе комплексом физико-химических и биологических методов были изучены супрамолекулярные амфифилы на основе классического катионного цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) и каликс[4]резорцина с *N*-метил-*D*-глюкаминовым фрагментом на верхнем ободе и сульфонатными группами на нижнем ободе (Рисунок 1).^[16]

Структура *N*-метил-*D*-глюкаминового каликс[4]резорцина (ГКР) позволяет предложить наличие отрицательно заряженного нижнего обода из-за диссоциации сульфонатных групп. Следовательно, формирование смешанных агрегатов с катионным ПАВ возможно благодаря электростатическим или инклюзивным взаимодействиям. Для подобных катионных смесей характерно образование везикулярных частиц, имеющих в своем составе гидрофильное ядро. Образование таких везикул возможно при более низких концентрациях, чем формирование мицеллярных структур.

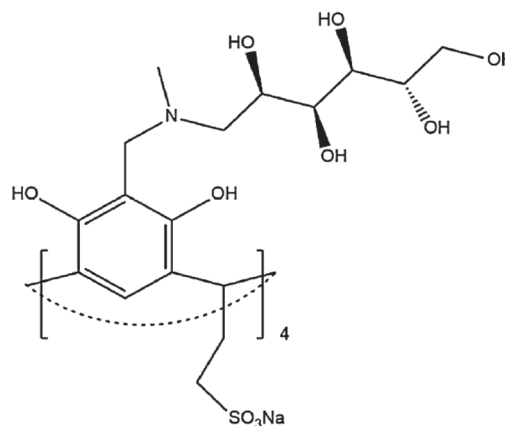


Рисунок 1. Химическая структура ГКР.

Другим преимуществом данного типа агрегатов является инкапсулирующая способность по отношению гидрофильным субстратам.

Стехиометрические комплексы каликс[4]резорцина и ПАВ, сформированные за счет зарядовой компенсации отрицательно заряженных сульфонатных групп каликс[4]резорцина положительно заряженными головными группами ПАВ, нестабильны в водной среде и выпадают в осадок, поэтому были подобраны соотношения каликс[4]резорцин:ПАВ, являющиеся наиболее оптимальными для инкапсуляции лекарственных препаратов, путем определения максимальной эффективности инкапсуляции (ЭИ) по отношению к родамину Б. При изучении инкапсуляции родамин Б в смешанных системах, содержащих 0.05 мМ ГКР и различные концентрации ЦТАБ (Рисунок 2А), максимальная инкапсуляция гидрофильного субстрата наблюдается для суперамфифильной системы, содержащей эквимольные количества компонентов. Стоит отметить, что, если значения ЭИ не изменяются при увеличении содержания ПАВ в растворе с ГКР, то размер совместных агрегатов при этом снижается. Вероятно, рост концентрации ПАВ в смеси с ГКР приводит к дополнительному образованию супрамолекулярных мицелл, формирование которых было продемонстрировано в других работах с использованием сульфонатных каликсаренов в присутствии избытка катионных амфифилов.^[17,18]

Для значений ЭИ и размеров частиц также была выявлена зависимость от концентрации суперамфифильной системы в целом. Первоначальное увеличение количества смешанной системы до 0.5 мМ приводит к увеличению капсулирующей способности с уменьшением гидродинамического диаметра частиц (Рисунок 2В). После концентрации 0.5 мМ значение ЭИ практически не изменяется при увеличении общей концентрации системы, в то время как размер агрегатов продолжает снижаться. Предположительной версией такого поведения является снижение числа бислоев в структуре везикул с ростом концентрации суперамфифила ГКР–ЦТАБ, а также возможным образованием дополнительных мицеллярных структур на основе суперамфифилов.

На основании изучения инкапсулирующей способности агрегатов ГКР–ЦТАБ было выявлено,

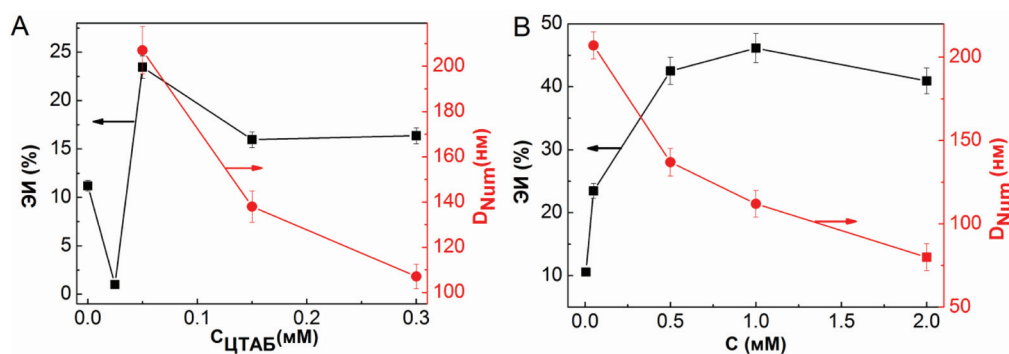


Рисунок 2. А – Зависимость ЭИ родамина Б и размеров агрегатов в системе ГКР:ЦТАБ, содержащей 0.05 мМ ГКР, от концентрации ЦТАБ; В – зависимость ЭИ родамина Б и размеров агрегатов в системе ГКР:ЦТАБ = 1:1 от общей концентрации супрамолекулярной системы.

что эквимолярная система 1 мМ ГКР–1 мМ ЦТАБ является наиболее оптимальной, поскольку обладает наибольшим значением ЭИ и небольшими размерами агрегатов. Образование везикул при этом соотношении было также подтверждено данными ТЭМ (Рисунок 3А), которые хорошо соотносятся с результатами динамического светорассеяния (Рисунок 3В).

Известно, что катионные ПАВ проявляют высокую антимикробную активность в диапазоне концентраций, соответствующем области до критической концентрации мицеллообразования (ККМ).^[19,20] Более того, их токсичность, обусловленная, в основном, катионным зарядом, может быть снижена с помощью везикулярных систем.^[21] Поэтому далее было проведено сравнительное исследование биологической активности водных систем на основе ЦТАБ и ГКР. Бактериостатическую активность исследуемых соединений определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде по отношению к штаммам *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Escherichia coli* F-50, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Bacillus cereus* 8035. Бактериальная нагрузка составляла 3.0×10^5 микробных тел/мл. Учет результатов проводили через каждые 24 ч в течение 5 суток. Посевы инкубировали при температуре 37 °С. Эксперимент повторяли три раза. Фунгистатическую активность водных растворов соединений по отношению

к грибам *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum* 1773, *Aspergillus niger* ВКМФ-1119 и дрожжеподобным грибкам *Candida albicans* 885-653 определяли методом серийных разведений на жидкой среде Сабуро. Время экспозиции в термостате при 25 °С с соответствующим соединением составляло 14 суток. За минимальную ингибирующую концентрацию принимали минимальную концентрацию вещества, задерживающую рост соответствующего тест-микроорганизма. Регистрировали наличие роста бактерий или грибов либо отсутствие его за счет бактериостатического или фунгистатического действия соединения. Бактерицидную и фунгицидную активности определяли по описанным ранее методиками.^[22]

В то время как ГКР оказался менее токсичен по отношению к клеткам тест-микроорганизмов, его незначительная антимикробная активность проявлялась только на грамположительные бактерии. Однако присутствие эквимолярного количества ГКР в растворе ПАВ, приводящее, как уже было сказано, к формированию агрегатов иной структуры, к сожалению, не снижает токсичность системы в целом (Таблица 1). Те же самые закономерности реализуются при оценке гемолитической активности,^[23] т.е. молекулы ПАВ вызывают полный гемолиз, каликсарен сильно не разрушает эритроциты, а в эквимолярной смеси ГКР–ЦТАБ снова наступает гемолиз (Таблица 2). Таким образом, сформированные композиции на основе

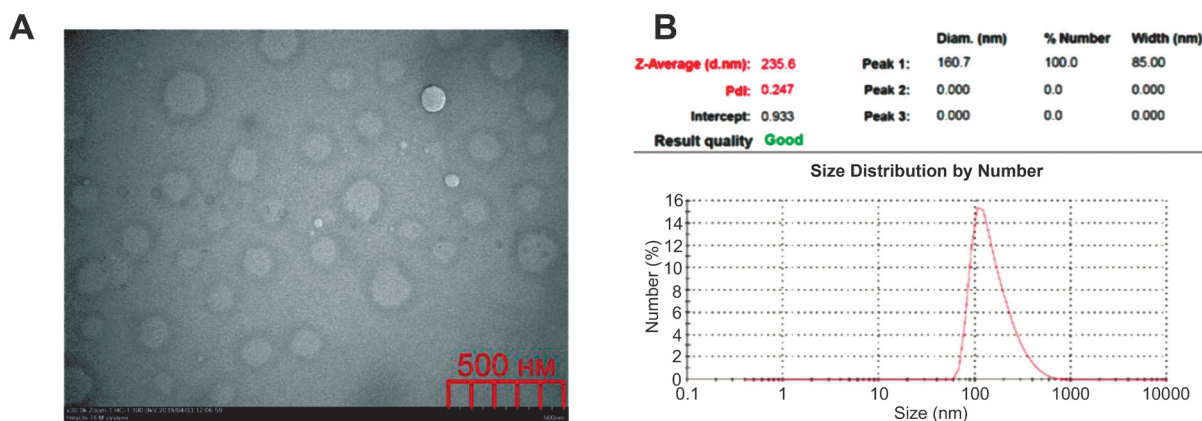


Рисунок 3. А – Изображения ТЭМ агрегатов в водной системе 1 мМ ГКР–1 мМ ЦТАБ; В – размеры частиц в водной системе 1 мМ ГКР–1 мМ ЦТАБ.

Таблица 1. Антимикробная активность индивидуальных (ЦТАБ и ГКР) и смешанной (ЦТАБ–ГКР) систем.

	<i>S. aureus</i> 209P	<i>B. cereus</i> 8035	<i>C. albicans</i> 855-653
Минимальные ингибирующие концентрации, мкМ			
Соединения	Бактериостатическая и фунгистатическая активность		
ГКР	1000.0 ± 87.4	>1000	>1000
ЦТАБ	1.00 ± 0.08	2.00 ± 0.16	16.0 ± 1.2
ГКР + ЦТАБ	1.60 ± 0.13	2.00 ± 0.19	13.1 ± 1.1
Минимальные бактерицидная и фунгицидная концентрации, мкМ			
Бактерицидная и фунгицидная активность			
ГКР	1000 ± 86	>1000	>1000
ЦТАБ	3.00 ± 0.23	12.0 ± 1.1	31 ± 2.6
ГКР + ЦТАБ	63.0 ± 4.9	63.0 ± 5.1	25 ± 1.9

катионного ПАВ и ГКР, содержащего сульфатные группы, сохраняют присущую индивидуальному ПАВ токсичность и гемолитическую активность.

Таким образом, в данной работе было показано, что *N*-метил-*D*-глюкаминный калекс[4]резорцин и ЦТАБ образуют супрамолекулярный амфифил, способный формировать везикулярные частицы в водной среде. Полученные везикулы инкапсулируют гидрофильный субстрат, эффективность инкапсуляции которого зависит не только от соотношения компонентов, но и от концентрации суперамфифила. В отличие от ПАВ, данный макроцикл менее токсичен по отношению к клеткам тест-микроорганизмов и эритроцитам, однако присутствие эквивалентного количества данного макроцикла в растворе ЦТАБ, приводящее к образованию везикул, сохраняет биологические свойства ПАВ. Следовательно, при выборе компонентов в создании суперамфифильной системы для биомедицинских приложений необходимо учитывать токсичные свойства исходных компонентов.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 17-73-20253).

Вклад авторов. РК написал статью. ЮР провела физико-химические эксперименты. АЗ и РМ синтезировали калекс[4]резорцин. АС и АВ провели биологические эксперименты. ЛЗ руководила исследованиями.

Список литературы

References

- Kim K.T., Meeuwissen S.A., Nolte R.J.M., van Hest J.C.M. *Nanoscale* **2010**, 2, 844–858.
- Wang Y.P., Ma N., Wang Z., Zhang X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2823–2826.
- Wang Y.P., Xu H., Zhang X. *Adv. Mater.* **2009**, 21, 2849–2864.
- Zhang X., Wang Ch. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 94–101.
- Tang Y., Zhou L., Li J., Luo Q., Huang X., Wu P., Wang Y., Xu J., Shen J., Liu J. *Angew. Chem.* **2010**, 122, 4012–4016.

Таблица 2. Гемолитическая активность индивидуальных (ЦТАБ и ГКР) и смешанной (ЦТАБ–ГКР) систем.

Система	Концентрация, мкМ	% гемолиза
ГКР	5000	85.6 ± 7.1
	2000	34.4 ± 2.8
	1000.0 ± 85.0	16.9 ± 1.3
	500.0 ± 39.5	8.8 ± 0.7
	250.0 ± 22.5	4.8 ± 0.4
ЦТАБ	5000	100
	2000	100
	1000.0 ± 84.3	100
	500 ± 42	100
	250 ± 23	100
ГКР + ЦТАБ	500.0 ± 40.4	100
	250.0 ± 21.6	100
	125 ± 11	100

- Li X., Qi Z., Liang K., Bai X., Xu J., Liu J., Shen J. *Catal. Lett.* **2008**, 124, 413–417.
- Nandan B., Kuila B.K., Stamm M. *Eur. Polym. J.* **2011**, 47, 584–599.
- Maciollek A., Munteanu M., Ritter H. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, 211, 245–249.
- Zhang H., Sun L., Liu Zh., An W., Hao A., Xin F., Shen J. *Colloids Surf., A* **2010**, 358, 115–121.
- Sun T., Li Yu., Zhang H., Li J., Xin F., Kong L., Hao A. *Colloids Surf., A* **2011**, 375, 87–96.
- Hermans T.M., Broeren M.A.C., Gomopoulos N., Smeijers A.F., Mezari B., Van Leeuwen E.N.M., Vos M.R.J., Magusin P.C.M.M., Hilbers P.A.J., Van Genderen M.H.P., Sommerdijk N.A.J.M., Fytas G., Meijer E.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15631–15638.
- Bojinova T., Coppel Y., Lauth-de Viguerie N., Milius A., RicoLattes I., Lattes A. *Langmuir* **2003**, 19, 5233–5239.
- Gohy J.F., Lohmeijer B.G.G., Varshney S.K., Schubert U.S. *Macromolecules* **2002**, 35, 4560–4563.
- Kabanov A.V., Bronich T.K., Kabanov V.A., Yu K., Eisenberg A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9941–9942.
- Kashapov R.R., Bekmukhametova A.M., Zakharova L.Ya., Akhmetzyanova Z.V., Popova E.V., Solovieva S.E., Antipin I.S., Konovalov A.I. *Macroheterocycles* **2017**, 10, 454–459.
- Kashapov R.R., Razuvayeva Y.S., Ziganshina A.Y., Mukhitova R.K., Sapunova A.S., Voloshina A.D., Syakaev V.V., Latypov S.K., Nizameev I.R., Kadirov M.K., Zakharova L.Y. *Molecules* **2019**, 24, 1939.
- Costa C., Francisco V., Silva S.G., do Vale M.L.C., Garcia-Río L., Marques E.F. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects* **2015**, 480, 71–78.
- Basilio N., García-Río L. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 9315–9319.
- Kashapov R.R., Razuvayeva Y.S., Ziganshina A.Y., Mukhitova R.K., Sapunova A.S., Voloshina A.D., Zakharova L.Y. *Colloids Surf., B* **2019**, 175, 351–357.
- Maneedaeng A., Phoemboon S., Chanthasena P., Chudapongse N. *Korean J. Chem. Eng.* **2018**, 35, 2313–2320.
- Colomer A., Pinazo A., Garcia M.T., Mitjans M., Vinardell M.P., Infante M.R., Martínez V., Pérez L. *Langmuir* **2012**, 28, 5900–5912.
- Semenov V.E., Mikhailov A.S., Voloshina A.D., Kulik N.V., Nikitashina A.D., Zobov V.V., Kharlamov S.V., Latypov S.K., Reznik V.S. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 4715–4724.
- Pashirova T.N., Zueva I.V., Petrov K.A., Lukashenko S.S., Nizameev I.R., Kulik N.V., Voloshina A.D., Almasy L., Kadirov M.K., Masson P., Souto E.B., Zakharova L.Y., Sinyashin O.G. *Colloids Surf., B* **2018**, 171, 358–367.

Received 05.05.2019
Accepted 16.05.2019