«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА»
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Григорян Илья Валентинович

Биофизические механизмы взаимодействий в биоподобных коллоидных системах на основе липидов, макромолекул и наночастиц

Специальность 1.5.2. Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук, доцент
Хомутов Геннадий Борисович

Москва – 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ 5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13

1.1 Биоподобные коллоидные системы 13

1.1.1 Биофизические особенности биоподобных коллоидных систем 13

1.1.2 Биоподобные коллоидные системы в биомедицине 14

1.1.3 Композитные биоподобные коллоидные системы 16

1.2 Особенности строения клеточной мембраны 19

1.2.1 Структура клеточной мембраны 19

1.2.2 Электрические свойства клеточных мембран 20

1.3 Биофизические механизмы взаимодействий коллоидных систем с липидными мембранами 22

1.3.1 Взаимодействие коллоидных систем с поверхностью липидной мембраны 22

1.3.2 Механизмы прохождения коллоидных объектов через липидные мембраны 26

1.3.3 Особенности взаимодействия железосодержащих МНЧ с липидными мембранами 29

1.3.4 Особенности взаимодействия ЦД с липидными мембранами 32

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 34

2.1 Получение биоподобных коллоидных систем 34

2.1.1 Получение железосодержащих МНЧ 34

2.1.2 Получение полимерных комплексов на основе молекул ПАК и спермина 35

2.1.3 Получение липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД 36
2.2 Методы структурно-функциональной диагностики 36
2.2.1 АСМ 36
2.2.2 ИК-Фурье спектроскопия 37
2.2.3 Динамическое светорассеяние 37
2.2.4 Метод электрофоретического светорассеяния 37
2.2.5 УФ-спектрофотометрия 38
2.2.6 ПЭМ 38
2.2.7 ЭПР 38
2.3 Модельные липидсодержащие системы 39
2.3.1 Планарные БЛМ 39
2.3.2 Ленгмюровские монослои 40
2.3.3 Липосомы 41
2.4 Методы изучения взаимодействия коллоидных систем с клетками 42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 44
3.1 Структурообразование в биоподобных коллоидных системах, содержащих противоположно заряженные компоненты 44
3.1.1 Формирование и свойства комплексов ПАК и спермина 44
3.1.2 Включение противоопухолевого препарата доксорубицина и железосодержащих МНЧ в состав комплексов ПАК и спермина 47
3.1.3 Структурообразование при взаимодействии β-КМЦД с липидными ленгмюровскими монослоями 52
3.2 Взаимодействие липосом, модифицированных β-КМЦД, с липидсодержащими системами 58

3.2.1 Экспериментальное исследование связывания липосом, модифицированных β-КМЦД, с липидсодержащими системами 58

3.2.2 Предполагаемый механизм взаимодействия липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, с рядом липидсодержащих систем 65

3.3 Взаимодействие исходно безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ с модельной планарной БЛМ 73

3.3.1 Прохождение железосодержащих МНЧ через модельную планарную БЛМ и образование комплексов МНЧ и молекул липидов 73

3.3.2 Биофизические механизмы взаимодействия и прохождения исходно безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ через модельную планарную БЛМ 83

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 87

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ 89

БЛАГОДАРНОСТИ 91

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И ТЕРМИНОВ 92

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 93

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Оценки изменений энергий при образовании полимерных комплексов ПАК и спермина 115

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Оценки изменений энергий, определяющих формирование надмолекулярных структур молекулами β-КМЦД на поверхности липидсодержащих систем 121

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Оценки изменений энергий в процессах взаимодействий в системе МНЧ – планарная БЛМ 126

ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Оценки состояния железосодержащих МНЧ в эксперименте по изучению взаимодействия МНЧ с модельной планарной БЛМ 137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность создания и исследования биоподобных коллоидных систем на основе липидов, макромолекул и наночастиц обусловлена современными тенденциями развития фундаментальных исследований процессов структурообразования и связи структуры и функций живых систем на клеточном и субклеточном, молекулярном и надмолекулярном уровнях. Формирование биологических и биоподобных коллоидных систем в объёмной водной фазе и на границах раздела фаз, включая поверхность липидных мембран, может сопровождаться сложными процессами самоорганизации компонентов с образованием надмолекулярных структур, свойства которых не сводятся к простой сумме свойств исходных компонентов. Вместе с тем, недостаточно изучена роль межкомпонентных и межфазных взаимодействий в определении закономерностей образования и структурной организации биоподобных коллоидных систем, а также механизмов их взаимодействий с липидсодержащими системами.

Настоящая работа посвящена экспериментальному исследованию формирования и структурной организации ряда биоподобных коллоидных систем на основе липидов, макромолекул и наночастиц в объёмной водной фазе и на границах раздела фаз, а также их взаимодействия с липидсодержащими системами. Под биофизическими механизмами взаимодействий в работе понимается совокупность физических и физико-химических процессов, взаимодействий и закономерностей, определяющих протекание процессов в биологических и биоподобных коллоидных системах. Рассмотрение систем различного состава и структурной организации позволяет сопоставить роль межмолекулярных, межкомпонентных и межфазных взаимодействий в исследуемых процессах и выявить характерные проявления биофизических механизмов в системах с различными уровнями структурной организации. Полученные данные и установленные закономерности могут служить основой для рационального

создания биоподобных коллоидных систем на основе липидов, макромолекул и наночастиц для решения задач биомедицины.

Степень разработанности темы

К настоящему времени накоплен значительный объём экспериментальных и теоретических данных о процессах комплексообразования и формирования надмолекулярных структур в системах на основе липидов, макромолекул и наночастиц, а также об особенностях взаимодействия коллоидных объектов с липидсодержащими системами. Перспективные для использования в биомедицине комплексы натриевой соли полиакриловой кислоты (ПАК) с биогенным полиамином сперминoм исследовались ранее. Однако при сравнительно небольшой молекулярной массе ПАК остаются недостаточно изученными закономерности их формирования, связь структуры со свойствами и возможность включения в состав комплексов противоопухолевых препаратов и железосодержащих магнитных наночастиц (МНЧ). Циклодекстрины (ЦД) и их производные представляют интерес для биомедицины благодаря способности включать водонерастворимые молекулы и образовывать надмолекулярные структуры, в том числе при взаимодействии с липидными системами. Известно образование комплексов β-карбоксиметилциклодекстринов (β-КМЦД) с липосомами из смеси электронейтрального и катионного липидов, сопровождающееся изменением свойств липосом. Недостаточно изучены формирование и пространственная организация структур β-КМЦД на поверхности ленгмюровских монослоёв и механизмы взаимодействия липосом, модифицированных β-КМЦД, с липидсодержащими системами. Железосодержащие МНЧ присутствуют в живых системах и перспективны для биомедицины. Имеются отдельные экспериментальные и теоретические работы об их взаимодействии с липидными мембранами; известны энергозависимые и неэндоцитозные пути проникновения МНЧ через клеточные мембраны. Изучены процессы и описаны механизмы взаимодействия отдельных МНЧ с модифицированной поверхностью с липидсодержащими системами. Взаимодействие безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ с

планарной БЛМ, в том числе во внешнем неоднородном стационарном магнитном поле, остаётся малоизученным.

Цель

Целью настоящей работы является выявление особенностей взаимодействий и характерных проявлений биофизических механизмов формирования и структурной организации ряда биоподобных коллоидных систем на основе липидов, линейных и циклических заряженных макромолекул и железосодержащих магнитных наночастиц в объёмной водной фазе и на границах раздела фаз, а также их взаимодействия с липидсодержащими системами.

Задачи

1. Получение биоподобных коллоидных систем на основе липидов, линейных и циклических заряженных макромолекул и железосодержащих МНЧ.

2. Экспериментальное исследование формирования коллоидных систем на основе ПАК и биогенного полиамина спермина, а также возможности включения в состав таких систем противоопухолевого препарата доксорубицина и железосодержащих МНЧ.

3. Исследование взаимодействия молекул β-КМЦД с ленгмюровскими монослоями из смеси электронейтрального и катионного липидов, а также выявление механизма взаимодействия липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, с рядом липидсодержащих систем.

4. Исследование взаимодействия исходно безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ с модельной планарной БЛМ из азолектина во внешнем неоднородном стационарном магнитном поле.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются биоподобные коллоидные системы на основе липидов, линейных и циклических заряженных макромолекул и железосодержащих магнитных наночастиц, а также липидсодержащие системы, с которыми они взаимодействуют.

Предметом исследования является возможность создания биоподобных коллоидных систем на основе липидов, макромолекул и наночастиц, и закономерности формирования и структурной организации биоподобных коллоидных систем в объёмной водной фазе и на границах раздела фаз, особенности межкомпонентных и межфазных взаимодействий и характерные проявления биофизических механизмов их взаимодействия с липидсодержащими системами.

Научная новизна

Для коллоидных полимерных комплексов на основе ПАК с молекулярными массами 2100 Да, 8000 Да и 15000 Да и биогенного полиамина спермина выявлена зависимость гидродинамических размеров комплексов от молекулярной массы ПАК и отношения числа её мономерных звеньев к числу молекул спермина. Получены экспериментальные данные, указывающие на возможность включения в состав полимерных комплексов противоопухолевого препарата доксорубицина и железосодержащих МНЧ. Установлено, что молекулы β-КМЦД могут взаимодействовать с ленгмюровскими монослоями из смеси электронейтрального и катионного липидов с образованием надмолекулярных структур. Предложен механизм взаимодействия липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, с рядом липидсодержащих систем. В настоящей работе были получены новые экспериментальные данные, указывающие на возможность прохождения исходно безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ во внешнем неоднородном стационарном магнитном поле через модельную планарную БЛМ из азолектина. Установлено, что при взаимодействии таких МНЧ с планарной БЛМ и в результате их прохождения через мембрану могут образовываться комплексы МНЧ с молекулами липидов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых экспериментальных данных об особенностях формирования и структурной организации коллоидных комплексов и надмолекулярных структур в объёмной водной фазе и на границах раздела фаз, а также о характере взаимодействия

сформированных коллоидных объектов с липидсодержащими системами. Сопоставление экспериментальных результатов и физико-химических оценок энергии взаимодействия позволяет рассмотреть роль межкомпонентных и межфазных взаимодействий в исследуемых процессах. Общая фундаментальная важность полученных в работе данных обусловлена тем, что такие взаимодействия и процессы могут реализовываться и в живых системах на уровне липидных мембран клеток и клеточных органелл. Практическая значимость работы заключается в возможности использования выявленных особенностей формирования и структурной организации биоподобных коллоидных систем, а также их взаимодействия с липидсодержащими системами, при создании новых функциональных коллоидных систем на основе липидов, макромолекул и магнитных наночастиц, перспективных для биомедицинских применений, в том числе для управляемой доставки биологически активных и лекарственных веществ.

Методология и методы диссертационного исследования

Методология диссертационной работы основана на сравнительном экспериментальном исследовании процессов структурообразования в различных биоподобных коллоидных системах на основе липидов, линейных и циклических заряженных макромолекул и железосодержащих МНЧ, в том числе процессов формирования надмолекулярных и многокомпонентных структур, а также взаимодействия с липидсодержащими системами. Процессы формирования и комплексообразования исследовали как в объёмной водной фазе, так и на границе раздела фаз. Биофизические механизмы взаимодействий в рассмотренных системах изучались на примерах четырёх систем, представляющих фундаментальный и практический интерес, проявляющих процессы структурообразования на различных уровнях организации коллоидных систем и моделирующих процессы в биологических системах. Формирование коллоидных систем в объёмной водной фазе исследовали в системе противоположно заряженных молекул ПАК и биогенного полиамина спермина. Формирование надмолекулярных структур в коллоидных системах на границе раздела фаз исследовали при взаимодействии анионных молекул β-КМЦД

с монослоями из смеси электронейтрального и катионного липидов. Особенности взаимодействия многокомпонентных коллоидных систем с липидсодержащими системами изучали при связывании липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, а процессы формирования новых систем – при взаимодействии железосодержащих МНЧ с планарной БЛМ.

Структурные характеристики исследуемых систем изучали методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ), элементный состав – методом сканирующей энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС). Гидродинамические размеры и электрокинетические характеристики коллоидных систем определяли методами динамического светорассеяния и электрофоретического светорассеяния. Молекулярный состав и особенности межкомпонентного взаимодействия исследовали методами инфракрасной Фурье-спектроскопии (ИК-Фурье спектроскопии) и ультрафиолетовой спектрофотометрии (УФ-спектрофотометрии); формирование магнитной фазы в полимерных комплексах – методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В качестве модельных липидсодержащих систем использовали планарные БЛМ, липосомы и ленгмюровские монослои. Взаимодействие липосом с клетками исследовали методами конфокальной флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Для интерпретации экспериментальных данных использовали физико-химические модели и оценки энергий взаимодействия.

Положения, выносимые на защиту

1. Взаимодействие биогенного полиамина спермина с молекулами ПАК с молекулярными массами 2100 Да, 8000 Да и 15000 Да приводит к образованию коллоидных полимерных комплексов, гидродинамический диаметр которых зависит от молекулярной массы полимера и отношения числа мономерных звеньев ПАК к числу молекул спермина. В состав полимерных комплексов могут быть включены молекулы противоопухолевого препарата доксорубицина и железосодержащие МНЧ.

2. Молекулы β-КМЦД могут взаимодействовать с ленгмюровскими монослоями из смеси электронейтрального и катионного липидов с образованием надмолекулярных структур высотой ~2 нм. Предложен механизм взаимодействия липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, с рядом липидсодержащих систем.

3. Исходно безлигандные катионные коллоидные железосодержащие МНЧ во внешнем неоднородном стационарном магнитном поле могут проходить через модельную планарную БЛМ из азолектина. В процессе взаимодействия МНЧ с мембраной и их прохождения через неё могут образовываться комплексы МНЧ с молекулами липидов мембраны с характерными размерами 10–300 нм.

Степень достоверности

Степень достоверности полученных результатов подтверждается использованием адекватных экспериментальных методов и согласием с литературными данными, проведением всех экспериментов в необходимом количестве независимых повторов, применением статистической обработки данных.

Апробация работы

Основные положения, результаты и выводы диссертации отражены в 6 научных статьях, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2 «Биофизика» по физико-математическим наукам [А1–А6].

Основные результаты диссертационной работы прошли апробацию на 8 российских и международных научных конференциях: II Зезинской школе-конференции для молодых ученых «Химия и физика полимеров» (Москва, 2022); XVII Курчатовской молодежной междисциплинарной научной школе (Москва, 2023); XXX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2023» (Москва, 2023); VII Съезде биофизиков России (Краснодар, 2023); XIX Международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы. Микитаевские чтения» (п. Эльбрус, Кабардино-Балкарская Республика, 2023); Международной

научной конференции «New Emerging Trends in Chemistry» (NewTrendsChem-2023) (Ереван, Армения, 2023); X Международной конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов – 2023 (наукоград Кольцово, Новосибирская область, 2023); VI Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (IC CCPCM), посвященной 125-летию со дня рождения П.А. Ребиндера (Казань, 2023).

Личный вклад автора

Основные научные результаты, представленные в диссертации, получены автором лично, за исключением специально оговорённых результатов совместных исследований, полученных при его непосредственном участии. Положения, выносимые на защиту, сформулированы и выдвинуты автором самостоятельно и защищаются впервые. Вклад автора в постановку исследований, проведение экспериментов, обработку и интерпретацию данных, подготовку иллюстративных материалов и текстов работ [А1–А6] был существенным. Измерения и регистрация экспериментальных данных, выполнявшиеся совместно с соавторами либо осуществлявшиеся оператором прибора, во всех случаях проводились при непосредственном активном участии автора.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, списка публикаций автора по теме диссертации, благодарностей, списка сокращений, условных обозначений и терминов, списка литературы, а также четырёх приложений. Работа изложена на 141 странице, содержит 34 рисунка; библиографический список включает 242 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биоподобные коллоидные системы

1.1.1 Биофизические особенности биоподобных коллоидных систем

Коллоидные системы представляют собой многофазные гетерогенные системы, в которых по меньшей мере одна из фаз существует в виде малых частиц, распределённых в дисперсионной среде и имеющих размеры, существенно меньшие по сравнению с характерными масштабами системы. По своим свойствам такие системы занимают промежуточное положение между объёмными фазами и индивидуальными молекулами, ионами или атомами, из которых эти фазы образованы. Так как отношение площади поверхности коллоидных частиц радиусом r к объёму частицы возрастает как $1/r$, вклад молекул и атомов на поверхности частиц и вклад самой поверхности тем больше, чем меньше размеры частицы. В результате на микронных и субмикронных масштабах возрастает вклад поверхностных явлений на границах раздела фаз, что обуславливает уникальные физико-химические свойства коллоидов, которые могут быть не присущи тем же веществам на макроуровнях [1–5]. Состояние поверхности коллоидов, в том числе поверхностный заряд, может определять характер взаимодействия дисперсных частиц с окружающей средой и друг с другом. Агрегативная устойчивость таких систем определяется балансом действующих между частицами сил, среди которых важную роль играют электростатические и молекулярные взаимодействия; изменение состояния поверхности способно изменять этот баланс и, соответственно, определять структурообразование в дисперсной системе [6–8].

Живые системы на клеточном и субклеточном уровнях – коллоидные системы. В биологических водных средах коллоидные объекты представлены компонентами биологических жидкостей, форменными элементами крови, вирусами, липидными везикулами, клеточными органеллами и другими надмолекулярными структурами. При этом представление о живой природе как об особым образом организованной системе имеет глубокие корни в отечественной

научной школе [9,10]. В современной науке данный подход находит отражение в концепции биоподобия, одними из проявлений которой являются создание коллоидных систем с использованием структурных компонентов, характерных для живой природы, в том числе липидов, макромолекул и наночастиц, а также систем, моделирующих процессы в биологических системах [11–14].

1.1.2 Биоподобные коллоидные системы в биомедицине

Особенности физико-химических свойств коллоидных систем обеспечивают их широкое применение для решения разнообразных задач биомедицины [15–17]. При этом коллоидные системы, разрабатываемые для биомедицинских применений, как правило, имеют размеры от единиц до сотен нанометров, что соответствует характерным масштабам объектов, способных эффективно взаимодействовать с такими биологическими дисперсионными средами, как кровь и межклеточная жидкость [17,18]. Ключевой является возможность использования коллоидных систем в качестве систем направленной доставки лекарственных и биологически-активных соединений благодаря возможности солюбилизации и стабилизации с их помощью водонерастворимых веществ в биологических средах [19,20]. Значительное число фармацевтических препаратов сталкиваются с проблемой плохой растворимости в воде, что приводит к низкой биодоступности и проблемам с внедрением лекарственных средств [21–23]. Для повышения биодоступности гидрофобных соединений широкий потенциал имеет использование молекул циклодекстринов (ЦД) – циклических олигосахаридов, образованных олигомерами глюкозы, структура которых с гидрофильной внешней поверхностью и гидрофобной полостью позволяет формировать комплексы включения с гидрофобными фрагментами молекул лекарственных средств, улучшая растворимость, стабильность и биодоступность лекарственных препаратов [24–26]. Молекулярная структура ЦД позволяет создавать системы с различными свойствами, отличающимися числом остатков глюкозы, радикалами, заместителями [27]. Особый интерес представляют производные анионного ЦД – β-карбоксиметилциклодекстрины (β-КМЦД), молекулы которого имеют семь

глюкозных остатков, а часть атомов водорода в гидроксильных группах замещена на карбоксиметильные группы (*CH_2COOH*), что обеспечивает молекуле β-КМЦД отрицательный заряд при физиологических значениях pH и большую водорастворимость по сравнению с нативными молекулами β-ЦД [28]. В то же время гидрофобная внутренняя полость β-КМЦД способна включать неполярные молекулы, обеспечивая их локализацию в водной фазе в комплексе с β-КМЦД [29,30].

С точки зрения применения в биомедицине интерес представляет создание систем доставки лекарственных соединений в целевые области организма для снижения побочных эффектов от воздействия лекарственного соединения на весь организм, что имеет особенное значение в химиотерапии онкологических заболеваний [31]. Накопление инкапсулированных в коллоидных частицах цитостатиков в целевых областях организма может достигаться благодаря эффекту повышенной проницаемости и удержания (Enhanced Permeability and Retention, EPR) – эффекту накопления коллоидных частиц в области активного роста опухолей, проявляющемуся из-за образования дефектов в стенках кровеносных сосудов и ухудшения лимфодренажа, которые возникают вследствие структурных патологий микроокружения опухолей [32–34]. Большой потенциал имеет использование магниточувствительных частиц, в том числе железосодержащих МНЧ оксидов железа *Fe_3O_4* и *γ-Fe_2O_3* в качестве систем направленной доставки биологически-активных соединений [35–37]. Магниточувствительные системы могут также выступать в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ), биосенсоров, а также применяться для гипертермии поражённых тканей (см. рис. 1.1) [38].

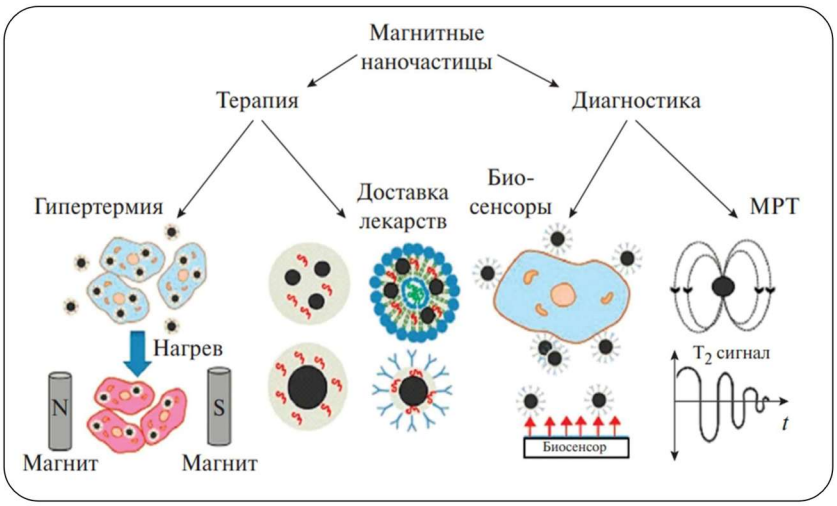


Рисунок 1.1 – Варианты использования магнитных наночастиц в медицине [17]

Биогенные железосодержащие МНЧ присутствуют в различных живых организмах, чувствительных к магнитному полю Земли, являются относительно малотоксичными и находят своё применение в биомедицине [39–41]. При этом использование МНЧ в качестве компонентов коллоидных систем отвечает принципу биоподобия [42].

1.1.3 Композитные биоподобные коллоидные системы

Большой потенциал для использования в биомедицине имеют композитные коллоидные системы, которые могут обладать синергетическими свойствами, не сводимыми к простой сумме свойств отдельных компонентов. Так, МНЧ могут выступать в качестве структурных компонентов полимерных гелей, играя роль «сшивки» и обеспечивая композитам магнитные свойства [43]. Подобные системы находят широкое применение как для направленной доставки биологически-активных и лекарственных соединений во внешнем магнитном поле, так и для тканевой инженерии, для контрастирования МРТ и других биомедицинских направлений [44,45].

Интерес представляет создание композитных коллоидных структур на основе ЦД. Причём ЦД могут использоваться как вне комплексов [46], так и, к примеру, использоваться для модификации поверхности наночастиц (НЧ), что позволяет изменять характер их взаимодействия с клеточными мембранами [47]. Особенный интерес представляют коллоидные системы

на основе липосом, модифицированных ЦД [48]. Гидрофобные биологически-активные соединения могут быть встроены как в гидрофобную область бислоя липосом, так и внутрь молекул ЦД, которые, в свою очередь, могут быть локализованы во внутреннем объёме или на поверхности липосом, что может значительно повысить загрузку коллоида биологически-активным соединением [49–52]. В то же время модификация мембран анионных липосом молекулами ЦД обеспечивает направленный транспорт коллоидов за счёт распознавания клеток-мишеней [53] и может быть использована для повышения эффективности трансфекции молекул ДНК внутрь клеток [48]. Для систем с молекулами ЦД характерны процессы самоорганизации, при которых молекулы ЦД способны формировать сложные, в том числе надмолекулярные, структуры как за счёт особенностей химической структуры [54,55], так и за счёт образования комплексов включения с гидрофобными соединениями (см. рис. 1.2) [56,57].

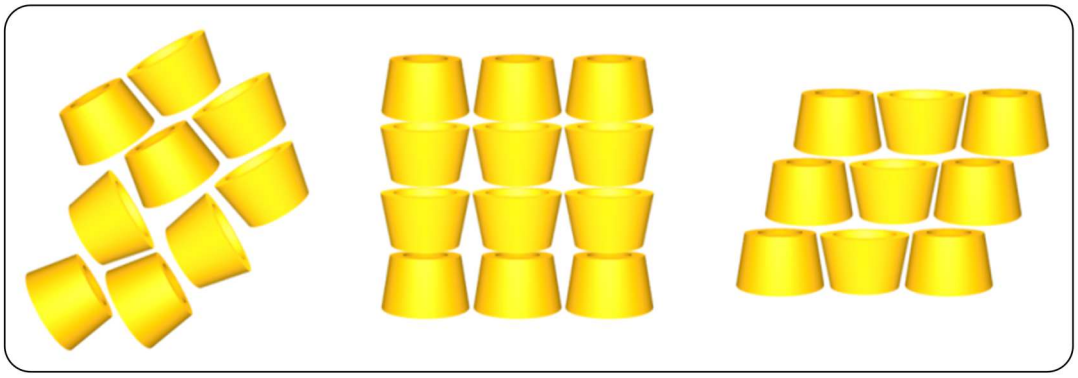


Рисунок 1.2 – Схематические изображения надмолекулярных образований молекул ЦД. Адаптировано из [58]

Также интерес представляет создание композитных коллоидных систем на основе биогенного полиамина спермина. При физиологических значениях pH у спермина преобладает полностью протонированная форма [59]. В водном растворе наиболее энергетически выгодной для молекулы спермина является линейная структура, не содержащая внутримолекулярных водородных связей [60]. При этом молекула спермина сохраняет конформационную подвижность [61]. Данные свойства спермина обуславливают его возможность связываться с внутриклеточными полианионными молекулами: щелочными белками,

нуклеиновыми кислотами, глюкозоаминогликанами, некоторыми липидами клеточной мембраны [62–66], а также возможность амфифильной производной спермина, стеароилспермина, образовывать ленгмюровские монослои и межфазные комплексы с ДНК и МНЧ [67]. Полиамины, в частности спермин, также участвуют в регуляции структуры и функциональной активности ДНК [68–71], могут образовывать комплексы с РНК [72,73], модулировать трансляцию [74], выступать блокатором K^+-каналов [75–77], нейтрализовать свободные радикалы [78,79], играть роль регуляторных факторов местного действия [62,80,81]. Компактизация молекул ДНК при связывании с полиаминами и гистонами является наиважнейшим примером структурообразования на молекулярном уровне. Кроме того, полиамины играют важную роль в регуляции клеточной пролиферации и окислительного стресса; их дисбаланс связан с развитием различных патологий [82]. Применение конъюгатов спермина с противоопухолевыми препаратами может позволить нацеливать их на специфичные рецепторы – транспортную систему полиаминов [83,84]. В то же время спермин может выступать в качестве компонента композитных коллоидных систем для доставки лекарственных средств [85,86], в том числе выступать в качестве связующего агента в полимерных нанокомпозитах [87]. Примечательно, что использование спермина в качестве структурного компонента может изменять характер взаимодействия коллоидов с клетками – так, известно, что спермин может способствовать усилению парацеллюлярного транспорта комплексов за счёт связывания с клетками эпителия [88].

Изучению взаимодействия спермина с молекулами ПАК и созданию коллоидных систем на основе спермина с включением в состав комплексов молекул противоопухолевого препарата доксорубицина и железосодержащих МНЧ посвящён один из разделов диссертационной работы.

1.2 Особенности строения клеточной мембраны

1.2.1 Структура клеточной мембраны

Мембрана животных клеток является сложноорганизованной структурой, основными компонентами которой являются липидный бислой, трансмембранные белки и гликокаликс (рис. 1.3).

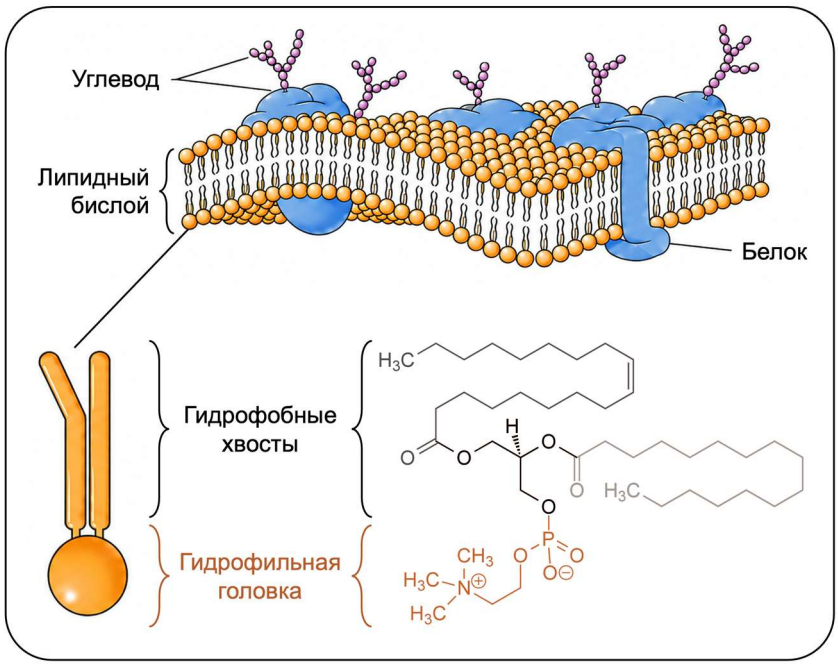


Рисунок 1.3 – Схема строения клеточной мембраны

Ключевыми липидами мембран животных клеток являются фосфолипиды. Наиболее распространены в живых системах цвиттер-ионные фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин, а также анионные фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, фосфатидная кислота [89]. Благодаря своей структуре липиды клеточного бислоя бифильны – имеют сродство к двум средам. Принцип независимости поверхностного действия определяет процессы структурообразования в липидсодержащих системах, которые можно отнести к процессам самоорганизации в живых системах. В зависимости от размеров полярных голов и гидрофобных хвостов липидов, а также условий среды, липиды могут образовывать различные структуры [90]. Для изучения свойств клеточных мембран, а также для изучения взаимодействия различных коллоидов с клеточными мембранами могут быть использованы модельные

липидсодержащие системы, имитирующие как сами клеточные мембраны, так и их поверхность. Основными модельными липидсодержащими системами являются ленгмюровские монослои, липосомы, а также планарные бислойные липидные мембраны (БЛМ).

1.2.2 Электрические свойства клеточных мембран

Поверхность клеточной мембраны, а также поверхности большинства биологических коллоидов – белков, липидных везикул и других коллоидных частиц – при физиологических условиях могут нести электрический заряд. Липидная мембрана является электрически неоднородной межфазной системой, поверхностный заряд которой формируется в результате переориентации диполей липидных головок, электролитической диссоциации функциональных групп липидов, белков и углеводных компонентов мембраны, перераспределения подвижных ионов в водной фазе. В водной фазе у поверхности мембраны возникает область пространственного разделения зарядов, которая включает плотный слой ионов у поверхности и диффузную часть, в которой концентрации ионов постепенно приближаются к объёмным значениям – двойной электрический слой. В экспериментальных исследованиях электрокинетических свойств коллоидных частиц широко используют ζ-потенциал – электрический потенциал в плоскости гидродинамического скольжения, разделяющей слой жидкости, движущийся совместно с частицей, и окружающую дисперсионную среду. ζ-потенциал связан с электрическим потенциалом поверхности частицы, однако в общем случае не равен ему. Для описания распределения потенциала у заряженной поверхности используются модели двойного электрического слоя. В модели Гельмгольца противоионы рассматриваются как компактный слой зарядов, а межфазная область представляется как плоский конденсатор, при этом в модели не учитывается тепловое движение ионов и диффузный характер их распределения в системе. Модель Гуи-Чапмена рассматривает ионы как подвижные частицы, распределённые в электрическом потенциале мембраны в соответствии

с формулой Больцмана. Пространственное распределение электрического потенциала в диффузной части двойного электрического слоя описывается классическим уравнением Пуассона-Больцмана [91]:

$$\frac{d^2\psi(x)}{dx^2} = -\frac{1}{\varepsilon_в \varepsilon_0}\sum_i z_i F C_i(\infty) e^{-\frac{Z_i F\psi(x)}{RT}}, \quad (1.1)$$

где $\varepsilon_в \sim 80$ – относительная диэлектрическая проницаемость среды для воды; $\varepsilon_0 = 8{,}854 \times 10^{-12}\ {Ф}/{м}$ – диэлектрическая постоянная; z_i – заряд i-го носителя заряда, $F \sim 96485\ {Кл}/{моль}$ – постоянная Фарадея, $C_i(\infty)$ – равновесная концентрация i-го носителя заряда, $R = 8{,}31\ {Дж}/{(моль \cdot К)}$ – универсальная газовая постоянная, $T \approx 300$ К – температура среды.

Для малых потенциалов ($\left|\frac{Z_i F\psi(x)}{RT}\right| \ll 1$) уравнение Пуассона-Больцмана (1.1) может быть линеаризовано до уравнения Гельмгольца:

$$\nabla^2\psi = \kappa^2\psi \quad (1.2)$$

где $\kappa = \frac{1}{\lambda_D}$ – обратная длина Дебая λ_D определяет масштаб электростатических взаимодействий в системе.

В приближении Дебая-Хюккеля, справедливом при малых значениях электрического потенциала, длину Дебая можно оценить как:

$$\kappa^{-1} = \lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon\varepsilon_0 k_Б T}{2000 e^2 N_A I}}, \quad (1.3)$$

где $N_A = 6{\times}10^{23}$ – постоянная Авогадро, $k_Б$ - постоянная Больцмана, $e = 1{,}6{\times}10^{-19}$ Кл – элементарный заряд, $\lambda_D = 0{,}78$ нм при $I = 0{,}15$ М.

Модель Штерна развивает представление Гуи-Чапмена о двойном электрическом слое, учитывая наличие компактного слоя Штерна вблизи поверхности и диффузного слоя в объёмной фазе. В рамках модели падение потенциала происходит сначала в плотной области у поверхности, а затем в диффузном слое. Модели Гельмгольца, Гуи-Чапмена и Штерна дают модельное физическое описание двойного электрического слоя, однако реальная липидная мембрана не является идеальной плоской однородной поверхностью. Мембрана имеет конечную толщину, внутренний профиль диэлектрической проницаемости,

слой полярных головок и связанной воды, а её компоненты способны к латеральной диффузии. Степень экранирования заряженной поверхности определяется ионной силой среды. При увеличении концентрации ионов в объёме раствора возрастает плотность противоионов у поверхности, диффузный слой сжимается, а потенциал быстрее убывает с расстоянием. По этой причине увеличение ионной силы в системе, как правило, приводит к уменьшению модуля ζ-потенциала. Вместе с тем экранирование заряда не устраняет возможность короткодействующего электростатического взаимодействия при непосредственном контакте противоположно заряженных групп. Другим ключевым фактором среды является величина pH, которая определяет степень протонирования и депротонирования функциональных групп биомолекул, а следовательно, и поверхностный заряд биоколлоидов. Для слабокислотных и слабоосновных групп состояние заряда может быть описано уравнением Гендерсона-Хассельбаха. При pH ниже pKa основные группы преимущественно протонированы, а при pH выше pKa – депротонированы. Компоненты буфера также могут взаимодействовать с поверхностью коллоидов, изменять локальное состояние поверхностных групп, сдвигать изоэлектрическую точку и определять коллоидную устойчивость системы [92].

1.3 Биофизические механизмы взаимодействий коллоидных систем с липидными мембранами

1.3.1 Взаимодействие коллоидных систем с поверхностью липидной мембраны

Взаимодействие коллоидного объекта с липидной мембраной клетки определяется балансом энергий. При этом поверхностный заряд объекта является ключевым фактором, определяющим взаимодействие с липидной мембраной. Так, объекты, имеющие положительный заряд поверхности, при взаимодействии с клеточной мембраной могут взаимодействовать с фосфатной группой фосфолипидов – основного компонента клеточных мембран. Взаимодействие заряженных объектов с фосфолипидной мембраной может сопровождаться

переориентацией фосфохолиновых головок и изменением локальной упаковки липидов (рис. 1.4) [93–95].

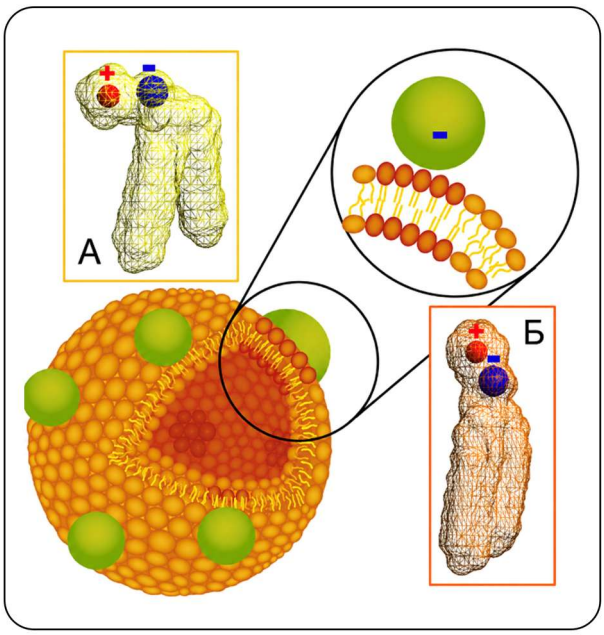


Рисунок 1.4 – Схематическое изображение переориентации липидной головки при связывании наночастицы с поверхностью фосфолипидной мембраны липосомы. Вызванная связыванием переориентация головной группы липида приводит к тому, что липиды в жидкой фазе имеют более низкую плотность (А), чем в гелеобразной фазе (Б). В составе фосфохолиновой головки атомы P^- и N^+ обозначены синим и красным цветами, соответственно [95]

Положительно заряженные объекты могут вызывать частичную деполяризацию отрицательно заряженной мембраны и перераспределение липидов в мембране [96,97]. Как было показано в предыдущем разделе, электрическое состояние липидной мембраны определяется, в первую очередь, поверхностным зарядом, дипольной организацией полярных головок липидов и распределением ионов в двойном электрическом слое. При этом взаимодействие коллоидного объекта с мембраной может быть рассмотрено в терминах совокупности отдельных энергетических вкладов. Рассмотрим ряд ключевых из них.

Характерной длиной электростатического взаимодействия зарядов в водной среде является длина Бьеррума [91]:

$$l_Б = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_в k_Б T}. \quad (1.4)$$

При $T = 298$ К для воды $l_Б \approx 0{,}7$ нм. В приближении Дебая-Хюккеля кулоновский вклад в свободную энергию взаимодействия двух заряженных центров можно представить как [91]:

$$\frac{\Delta G_{эл}}{k_Б T} = z_{ан} z_{кат} \frac{l_Б}{r} exp\left(-\frac{r}{\lambda_Д}\right). \quad (1.5)$$

Здесь $z_{ан}$ и $z_{кат}$ – зарядовые числа взаимодействующих анионного и катионного центров. При $r = \lambda_Д = 0{,}78$ нм модуль взаимодействия двух одновалентных центров составляет $\sim 0{,}3 k_Б T$: для противоположно заряженных групп $\Delta G_{эл} < 0$, а для одноимённо заряженных групп $\Delta G_{эл} > 0$. При образовании нескольких контактов суммарный электростатический вклад определяется числом одновременно взаимодействующих зарядов. При сближении противоположно заряженных групп энергетический выигрыш определяется не только кулоновским притяжением, но и высвобождением в объём противоионов, ранее локализованных вблизи заряженных центров [98], что особенно важно при образовании интерполиэлектролитных систем [99]. Энтропийный вклад можно оценить как

$$\frac{\Delta G_{пр}}{k_Б T} = -N_{ион} ln\left(\frac{c_{лок}}{c_{об}}\right), \quad (1.6)$$

где $N_{ион}$ – число высвобождаемых противоионов, $c_{лок}$ – их эффективная локальная концентрация в связанном состоянии, $c_{об}$ – эффективная концентрация в объёме раствора. При этом $N_{ион}$ и $c_{лок}$ зависят от строения взаимодействующих групп.

В линейном приближении Дебая-Хюккеля потенциал у квазиплоской заряженной поверхности экспоненциально уменьшается с расстоянием от поверхности D [91]:

$$\psi(D) = \psi_0 e^{-\frac{D}{\lambda_Д}}. \quad (1.7)$$

Работа переноса заряда q из области с нулевым потенциалом в потенциал $\psi(D)$ определяется выражением

$$\Delta G_{зар}(D) = q\psi(D). \quad (1.8)$$

Использование ζ-потенциала в качестве оценки эффективного поверхностного потенциала может дать приближённую модельную оценку электростатического вклада.

Формирование плотного контакта между частицей и поверхностью мембраны требует частичного вытеснения связанной воды из приповерхностной области. Соответствующий вклад энергии дегидратации можно оценить как [100]:

$$\Delta G_{\text{дег}} = \gamma_{\text{эфф}} \Delta A, \tag{1.9}$$

где $\gamma_{\text{эфф}}$ – эффективная свободная энергия дегидратации на единицу площади, ΔA – площадь дегидратируемой области контакта.

На малых расстояниях дополнительный вклад может быть связан с взаимодействием между заряженным объектом и диполями полярных головок липидов. Энергия взаимодействия отдельного диполя:

$$\Delta G_{\text{дип}} = -\boldsymbol{pE}. \tag{1.10}$$

Здесь $\boldsymbol{p}$ – дипольный момент полярной группы липида, $\boldsymbol{E}$ – напряженность локального электрического поля.

На расстояниях, превышающих область непосредственного молекулярного контакта, существенный вклад во взаимодействие мембраны и коллоидного объекта может создавать энергия Ван-дер-Ваальса. Энергия данного взаимодействия для сферической частицы радиусом $R_{\text{ч}}$ у плоской поверхности при расстоянии между поверхностями $D \ll R_{\text{ч}}$ в приближении Дерягина:

$$\Delta G_{\text{вдВ}}(D) = -\frac{A_{\text{Г}} R_{\text{ч}}}{6D}, \tag{1.11}$$

где $A_{\text{Г}}$ – постоянная Гамакера для системы. Её величина зависит от типа коллоида, состава мембраны и условий среды.

Таким образом, взаимодействие коллоидного объекта с поверхностью мембраны можно рассмотреть в рамках баланса ряда физико-химических взаимодействий.

1.3.2 Механизмы прохождения коллоидных объектов через липидные мембраны

Согласно правилу Коэна, на границе раздела фаз с различной диэлектрической проницаемостью происходит разделение зарядов: фаза с большей диэлектрической проницаемостью в среднем приобретает положительный потенциал относительно фазы с меньшей диэлектрической проницаемостью [101]. Так, на границе раздела «вода – воздух» может наблюдаться скачок потенциала – положительный потенциал водной фазы относительно газовой фазы. На границе «мембрана – водная фаза» ситуация определяется не только различием диэлектрической проницаемости, но и ориентацией диполей полярных головок липидов, молекул воды и функциональных групп в поверхностном слое мембраны. Вследствие этого гидрофобная область липидной мембраны может обладать внутренним потенциалом порядка 200–400 мВ (рис. 1.5) [102].

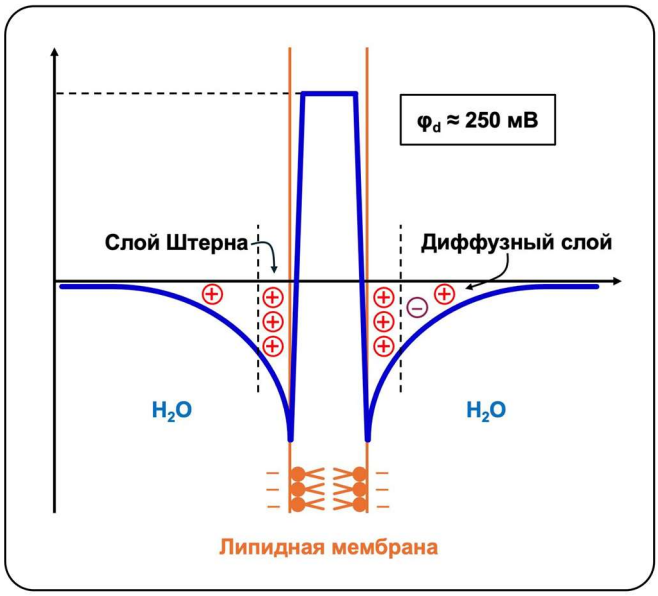


Рисунок 1.5 – Схема образования электрического потенциала мембраны в соответствии с правилом Коэна

В результате перенос заряда через гидрофобную область мембраны требует преодоления существенного энергетического барьера. При этом адсорбция заряженного объекта на поверхности мембраны и его перенос через гидрофобную область бислоя являются различными по энергетике процессами. Масштаб диэлектрического барьера переноса нескомпенсированного электрического заряда

из водной фазы в гидрофобную область мембраны можно оценить в рамках модели Борна [103]:

$$\Delta G_{\text{Борн}} = \frac{z^2 e^2}{8\pi\varepsilon_0 a_{\text{эфф}}}\left(\frac{1}{\varepsilon_{\text{мем}}} - \frac{1}{\varepsilon_{\text{в}}}\right), \quad (1.12)$$

здесь z – эффективный заряд объекта в единицах элементарного заряда, $a_{\text{эфф}}$ – эффективный радиус пространственного распределения заряда, $\varepsilon_{\text{мем}}$ и $\varepsilon_{\text{в}}$ – относительные диэлектрические проницаемости гидрофобной области мембраны и воды.

Для коллоидного объекта использование правила Борна отражает затраты на перенос заряда из водной фазы с высокой диэлектрической проницаемостью в менее полярную область мембраны и показывает принципиальную энергетическую невыгодность самопроизвольного перемещения нескомпенсированного заряда в гидрофобную область мембраны [91]. Такой перенос требует нейтрализации или экранирования заряда коллоида, образования липидной оболочки на поверхности коллоида, оборачивания мембраной, формирования поры или другого механизма, уменьшающего диэлектрический барьер. В результате, в то время как адсорбция катионных коллоидов на поверхности мембраны может быть энергетически выгодной, прохождение коллоида через мембрану требует преодоления потенциального барьера. В то же время для анионных коллоидов ключевой энергетический барьер могут создавать примембранные области. При этом механизм взаимодействия коллоида с мембраной определяется, в первую очередь, физико-химическими характеристиками как самих коллоидов, прежде всего размером, зарядом, особенностями поверхности, так и структурной организацией мембраны, особенностями клетки и условиями среды. Прохождение коллоидов через мембрану клетки возможно, как за счёт пассивного переноса, так и за счёт активных энергозависимых процессов [104]. Одним из ключевых механизмов прохождения коллоидов через клеточную мембрану является эндоцитоз, в процессе которого мембрана образует инвагинации, которые могут отделяться в виде внутриклеточных везикул – эндосом, включающих коллоиды. При этом

биофизические и биохимические аспекты проникновения коллоидов в клетку тесно связаны между собой. С биофизической точки зрения центральным процессом является оборачивание коллоида клеточной мембраной: вследствие межфазных взаимодействий формируется сферическая везикула, внутри которой находится коллоид [105]. Такой процесс требует преодоления энергетического барьера, связанного с изгибом и натяжением мембраны, а его величина определяется размером, формой и типом поверхности коллоида. Так, потенциальный барьер для более крупных частиц может оказаться существенно выше, чем для частиц малого размера [106]. С биологической точки зрения, эндоцитоз может быть инициирован связыванием коллоида с рецепторами на мембране, что может запустить локальную сборку белкового каркаса, например клатринового или кавеолинового, и последующую инвагинацию мембраны с захватом коллоида. Совокупность этих факторов определяет эффективность прохождения коллоидных частиц. Схемы эндоцитоза представлены на рисунке 1.6.

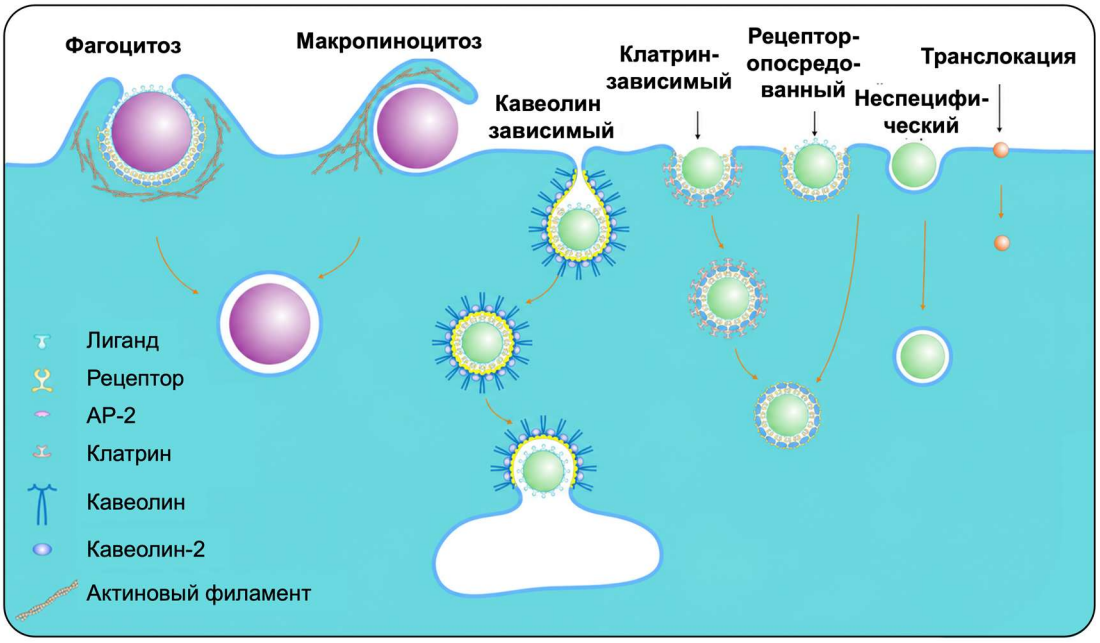


Рисунок 1.6 – Схемы эндоцитоза. Адаптировано из [107]

Важным примером переноса коллоидов через мембрану является трансцитоз, определяющий трансмембранный перенос коллоидных частиц через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), обусловленный совокупностью пассивных и активных механизмов [108,109]. Поверхность клеточной мембраны

покрыта гликокаликсом, содержащим протеогликаны гепарансульфата, обладающие выраженным отрицательным зарядом. В сочетании с отрицательным потенциалом клеточной мембраны это формирует высокий отрицательный заряд люминальной поверхности ГЭБ [110], что может способствовать переносу катионных молекул [111]. Понимание этих процессов имеет принципиальное значение для разработки эффективных коллоидных систем для использования в биомедицине.

1.3.3 Особенности взаимодействия железосодержащих МНЧ с липидными мембранами

Как было отмечено ранее, железосодержащие МНЧ, в том числе МНЧ магнетита Fe_3O_4, являются ключевым компонентом разнообразных коллоидных систем, в связи с чем важно понимать механизмы их взаимодействия с клеточными мембранами. Так, известно, что железосодержащие МНЧ могут проникать через клеточные мембраны не только посредством энергозависимого активного транспорта, но и через неэндоцитозные механизмы, о чём говорят работы по изучению взаимодействия частиц с эритроцитами [112], лишёнными эндоцитарной активности, с макрофагами при фармакологическом подавлении актин-зависимого фагоцитоза [113], с ооцитами *Xenopus laevis* [106]. Большую роль во взаимодействии с мембранами играют свойства поверхности [114–116], размер коллоида [106]. К примеру, в работе [117] исследовалось взаимодействие МНЧ маггемита γ-Fe_2O_3 с оболочкой из диоксида кремния SiO_2 (γ-Fe_2O_3@SiO_2) различного размера с липосомами из фосфатидилхолина, и методом криоэлектронной микроскопии было показано, что МНЧ диаметром больше 20 нм оказывались во внутреннем объеме липосом и были окружены липидным бислоем, в то время как МНЧ меньшего диаметра оставались связанными с наружной поверхностью липосомы. Наблюдаемый процесс проникновения МНЧ внутрь липосомы включал последовательное «распластывание» мембраны по поверхности МНЧ, оборачивание МНЧ липидным бислоем, формирование перешейка и его отделение (рис. 1.7а). В то же время модификация поверхности

МНЧ γ-$Fe_2O_3@SiO_2$ молекулами полиэтиленгликоля и аминогруппами препятствовала проникновению МНЧ внутрь липосом [116]. Теоретическое рассмотрение переноса МНЧ через мембрану может быть рассмотрено в терминах энергетического баланса энергии адгезии, энергии деформации бислоя и энергии поверхностного натяжения [118]. В работе [119] методами компьютерного моделирования было установлено изменение характера взаимодействия МНЧ с везикулой в зависимости от величины энергетического выигрыша при контакте МНЧ с поверхностью мембраны: при малом энергетическом выигрыше МНЧ оставалась на поверхности везикулы, а при увеличении выигрыша происходило оборачивание частицы, формирование перешейка и отрыв образовавшейся структуры (рис.1.7б). Авторы работы [120] исследовали локализованный на подложке из слюды липидный бислой из 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолина с нанесенными полярными частицами различного радиуса. Методом АСМ было показано, что над объектами с радиусами от 1,2 до 22,0 нм в липидном бислое образуются поры, тогда как более крупные МНЧ покрываются бислоем. Значительный интерес представляют результаты моделирования, представленные в работе [121], где были получены данные, указывающие на возможность кооперативного прохождения МНЧ через БЛМ (рис. 1.7в).

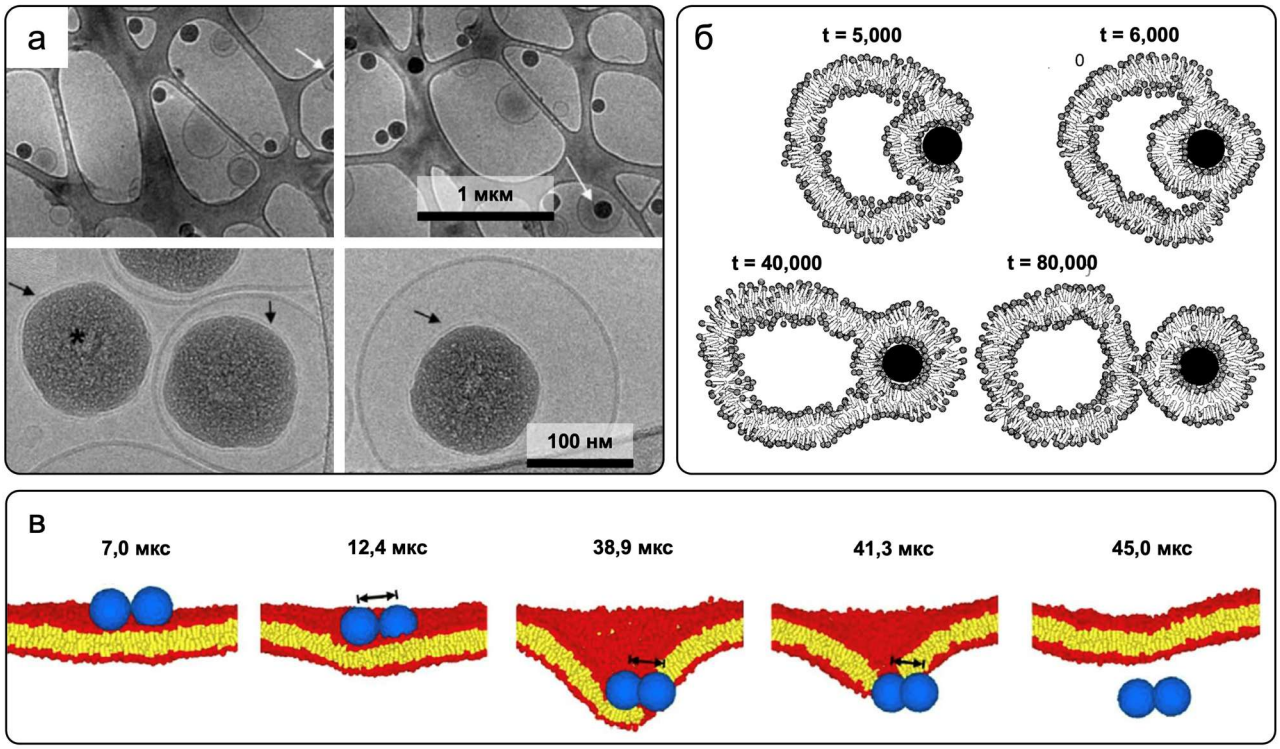


Рисунок 1.7 – Взаимодействие МНЧ с липидными системами: а – интернализация наночастиц γ-Fe_2O_3@SiO_2 в липосомы из фосфатидилхолина по данным криоэлектронной микроскопии, адаптировано из [117]; б – последовательные стадии адгезии МНЧ, находящейся снаружи модельной везикулы, адаптировано из [119]; в – кооперативное прохождение нескольких МНЧ при транслокации, адаптировано из [121]

Литературные данные указывают также и на возможность иных механизмов прохождения коллоидных МНЧ через мембрану: в работе [120] было показано, что МНЧ малого диаметра могут образовывать поры в липидном бислое, а в [122] была показана возможность прохождения катионной МНЧ через модельную липидную мембрану с отрицательным зарядом поверхности в слабом внешнем электрическом поле вследствие локального усиления мембранного потенциала в зоне контакта. Представленные работы подчёркивают большое разнообразие механизмов, объясняющих возможность прохождения МНЧ через БЛМ. Из литературы известно, что МНЧ могут выступать и как фактор слияния липидных систем: результаты моделирования в работе [119] показали, что МНЧ, связанная одновременно с двумя везикулами, способствовала слиянию везикул между собой. Примечательно, что магнитное поле может играть значительную роль при взаимодействии МНЧ с липидными системами: в работе [123] было показано, как МНЧ магнетита, поверхность которых была связана с амфифильным

белком, проникали внутрь лецитиновых липосом и вызывали их механическое разрушение при последующем воздействии магнитного поля. Большой интерес также представляет встраивание гидрофобизованных МНЧ в гидрофобную область БЛМ [124,125]. Таким образом, совокупность литературных данных указывает на существование различных механизмов прохождения МНЧ через БЛМ, что определяется сочетанием различных физико-химических параметров системы. Данный процесс является примером самоорганизации в биологических системах. В то же время возможность прохождения и механизмы взаимодействия безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ с липидными системами остается малоизученным. Исследованию взаимодействия исходно безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ с модельной планарной БЛМ посвящена одна из глав диссертации.

1.3.4 Особенности взаимодействия ЦД с липидными мембранами

Взаимодействие ЦД с клеточными мембранами определяется их структурой и имеет ряд особенностей. Так, слабозаряженные β-ЦД способны частично проникать в гидрофобную область мембраны, связываясь с поверхностной полярной областью липидного бислоя [126], в то время как для β-КМЦД глубина проникновения в гидрофобную область мембраны существенно меньше [30,127,128]. При этом увеличение отрицательного заряда молекул ЦД уменьшает вероятность их локализации на поверхности клеточных мембран и существенно снижает вероятность взаимодействия с некоторыми опухолевыми клетками, обладающими существенным отрицательным поверхностным зарядом [129,130]. Из литературы известно, что молекулы ЦД могут выступать переносчиками липидов [131,132], а также экстрагировать липиды, в том числе холестерин, из мембраны [133,134], что может приводить к изменению механических свойств мембран [135–138]. Способность ЦД связывать липиды определяет процессы, при которых агрегатообразование молекул ЦД может происходить на мембране. Так, в работе [139] показано, как ориентация β-ЦД на поверхности мембраны определяет экстракцию холестерина,

а также возможность формирования димеров на поверхности мембраны, способных взаимодействовать друг с другом, что, в свою очередь, приводит к образованию более крупных скоплений ЦД. Известно, что присутствие холестерина в мембране определяет латеральное фазовое разделение молекул β-ЦД на мембране, в то время как в отсутствии холестерина наблюдается равномерная адсорбция молекул на мембране [140]. Таким образом, литературные данные указывают на то, что мембрана выступает местом формирования агрегатов молекул ЦД. Изучению особенностей взаимодействия в липидсодержащих системах с β-КМЦД посвящена одна из глав диссертации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение биоподобных коллоидных систем

2.1.1 Получение железосодержащих МНЧ

В работе использовались исходно безлигандные катионные коллоидные железосодержащие МНЧ, полученные методом Массарта [А6][141]. Согласно протоколу, коллоидная суспензия содержала преимущественно МНЧ магнетита Fe_3O_4, при этом при физиологических условиях МНЧ магнетита могут окисляться до МНЧ оксида железа (III) – маггемита γ-Fe_2O_3, обладающих схожими с магнетитом магнитными свойствами [38].

Характерный размер МНЧ в исходной суспензии оценивался по данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). На рисунке 2.1а приведено ПЭМ-изображение МНЧ, на рисунке 2.1б — гистограмма распределения МНЧ по размерам. Средний диаметр МНЧ составил (4 ± 1) нм.

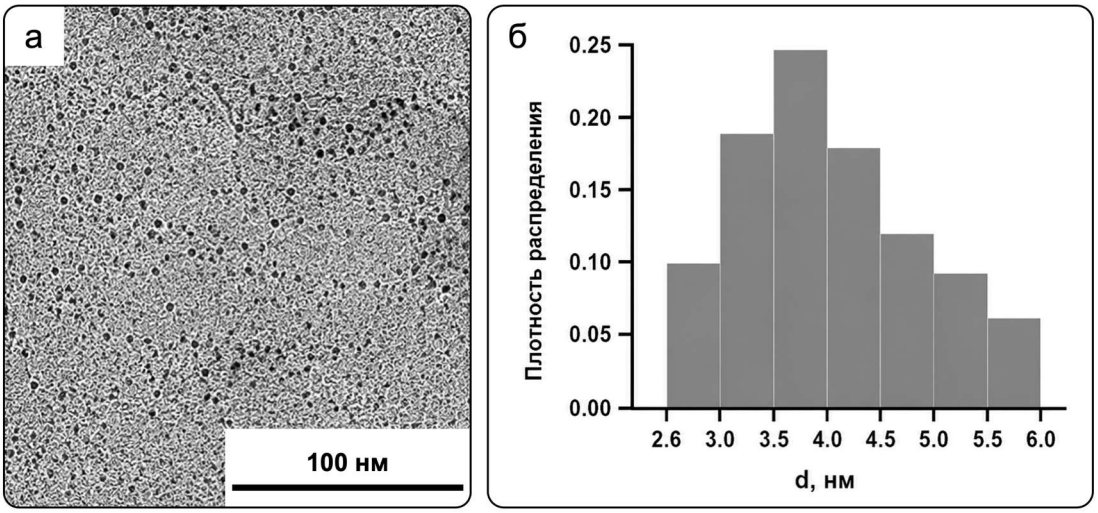


Рисунок 2.1 – Характеристика железосодержащих МНЧ, синтезированных и использованных в работе: а – ПЭМ-изображение МНЧ; б – гистограмма распределения МНЧ по размеру. По материалам [142]

В зависимости от особенностей системы для МНЧ Fe_3O_4 в воде характерна изоэлектрическая точка pI = 6,0–7,0 [143]. При уменьшении pH среды кислород может связывать протоны H+, что определяет положительный поверхностный заряд МНЧ и обеспечивает их зарядовую коллоидную стабильность при кислых значениях pH. При щелочных значениях pH ионы железа могут связывать

гидроксид-ионы *OH*–, что обуславливает отрицательный заряд поверхности МНЧ. Для обеспечения возможности работы с МНЧ при значениях pH = 7,0–7,2 исследование взаимодействия МНЧ с планарной БЛМ проводилось в среде ТРИС-*HCl* (Реахим, Россия). Для приготовления растворов использовалась деионизированная вода (Milli-Q) с проводимостью 0,05 мкСм/см. Так как при 25°C аминогруппа ТРИС имеет pK ≈ 8,1, согласно уравнению Гендерсона-Хассельбаха, при pH = 7,2 более 80 % молекул ТРИС находится в протонированной форме ТРИС*H*+, координация которых с атомами железа МНЧ обеспечивала сдвиг изоэлектрической точки МНЧ и обеспечивала их положительный ζ-потенциал [92,144,145]. Таким образом, выбор ТРИС в качестве буферной среды обусловлен необходимостью предотвратить коагуляцию МНЧ в области физиологических значений pH на масштабах времени, необходимых для достижения МНЧ мембраны. Формирование молекулами ТРИС*H*+ динамической оболочки на поверхности МНЧ также удовлетворяет цели исследования взаимодействия МНЧ без специфических лигандов-стабилизаторов на поверхности МНЧ, способных существенно изменять свойства МНЧ.

2.1.2 Получение полимерных комплексов на основе молекул ПАК и спермина

В работе использовался спермина тетрагидрохлорид (Fluka, Швейцария). Структура молекулы спермина представлена на рисунке 2.2.

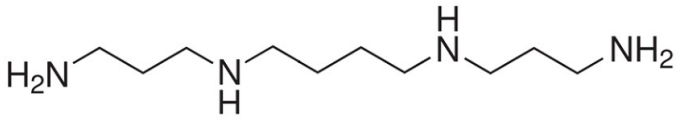


Рисунок 2.2 – Молекулярная структура спермина

Полимерные комплексы получали при комнатной температуре путём покапельного добавления водного раствора тетрагидрохлорида спермина к предварительно приготовленному водному раствору полимера при различных соотношениях числа мономерных звеньев полимера и числа молекул спермина. Перед приготовлением комплексов полимер растворяли в воде в течение суток.

В работе использовали ПАК с молекулярными массами 2100 Да, 8000 Да и 15000 Да (Хемрар, Россия), доксорубицина гидрохлорид (TEVA, Израиль), соль Мора (Хемрар, Россия), гипофосфит натрия (Хемрар, Россия). Получение магнитной фазы внутри полимерной матрицы проводили путём восстановления соли Мора гипофосфитом натрия в микрогелевой матрице согласно модифицированной методике из [146,147].

2.1.3 Получение липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД

В работе использовались органические растворители, включая этанол, метанол и хлороформ (Component Reactive, Россия), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ) и 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропанхлорид (ДОТАП) (Avanti Polar Lipids, США), а также β-карбоксиметилциклодекстрин (β-КМЦД) со степенью замещения 3 (Sigma-Aldrich, США). Катионные липосомы получали из смеси электронейтрального липида ДОФХ и катионного липида ДОТАП с молярной долей ДОТАП $x_{ДОТАП} = 0,3$ путем экструзии в соответствии с [148]. Флуоресцирующие липосомы готовили по той же методике с добавлением к липидной смеси 0,1 % 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, меченного Atto 488. Липосомы, модифицированные β-КМЦД, получали путем инкубации липосом с β-КМЦД.

2.2 Методы структурно-функциональной диагностики

2.2.1 АСМ

Атомно-силовой микроскоп Bruker (Bruker, США) использовали для изучения топографии поверхности коллоидных систем и ленгмюровских монослоёв. В качестве подложки для АСМ использовались свежие сколы слюды. Образцы изучались после полного высыхания. Измерения проводились в полуконтактном и резонансном режимах с использованием кантилеверов из поликремния с высокоточными составными зондами (TipsNano, Россия). Получение АСМ-изображений осуществлялось при техническом содействии

соавтора. Подготовка исследуемых образцов, анализ и интерпретация полученных АСМ изображений выполнены автором диссертации самостоятельно.

2.2.2 ИК-Фурье спектроскопия

Для анализа химической структуры агрегатов МНЧ и липидов исследовались спектры, полученные методом ИК-Фурье спектроскопии с ослабленным полным внутренним отражением на спектрометре Bruker TENSOR 27 (Bruker, Германия). Измерения проводили с использованием ячейки на основе кристалла *ZnSe* однократного отражения. Спектрометр был оснащён детектором, охлаждаемым жидким азотом, и термостатом (Huber, Германия). В ячейку вносили 50 мкл образца. Для каждого образца спектр накапливали по 70 сканам в диапазоне 1000–3000 $см^{-1}$ при спектральном разрешении 1 $см^{-1}$. После завершения измерений оптическую систему продували сухим воздухом с использованием компрессора (Jun-Air, Дания). Фоновый спектр буферного раствора регистрировали в тех же условиях и затем вычитали из спектра образца. Все измерения выполняли при температуре 25 °C. Обработку и анализ спектров проводили в программном обеспечении Bruker OPUS 8.1. Получение ИК-Фурье спектров осуществлялось при техническом содействии соавтора. Подготовка исследуемых образцов, анализ и интерпретация полученных данных выполнены автором диссертации самостоятельно.

2.2.3 Динамическое светорассеяние

Гидродинамические радиусы коллоидных частиц определяли методом динамического светорассеяния на приборе Brookhaven Zeta Plus (Brookhaven Instruments Company, США) и ALV-5 (ALV, Германия) с He-Ne-лазером.

2.2.4 Метод электрофоретического светорассеяния

ЭФП и ζ-потенциалы коллоидных систем определяли методом электрофоретического светорассеяния на приборе Brookhaven Zeta Plus (Brookhaven Instruments Company, США).

2.2.5 УФ-спектрофотометрия

Включение молекул доксорубицина в полимерные комплексы со спермином определяли методом УФ-спектрофотометрии на приборе ПЭ5400УФ (Россия).

2.2.6 ПЭМ

Изучение структуры и элементного состава образцов проводили методом ПЭМ высокого разрешения на микроскопе FEI Tecnai G2 30ST, оснащенном высокоугловым кольцевым детектором темного поля (High-Angle Annular Dark-Field, HAADF) и энергодисперсионным рентгеновским лучевым спектрометром (Energy-Dispersive X-ray spectroscopy, EDX, ЭДРС), работающим при ускоряющем напряжении 200–300 кВ. В качестве подложки для ПЭМ использовали стандартные сетки Formvar copper 300 с углеродным напылением. Получение ПЭМ-изображений осуществлялось при техническом содействии оператора прибора. Подготовка исследуемых образцов, анализ и интерпретация полученных данных выполнены автором диссертации самостоятельно.

2.2.7 ЭПР

Измерения методом ЭПР проводили на спектрометре Varian E-4 (США) при температуре 25 °C. Анализировали усреднённые результаты не менее пяти экспериментов. Метод ЭПР использовали для характеризации магнитной фазы в полимерных комплексах согласно [149,150]. Полимерные комплексы изучали в лиофилизированном виде. Получение ЭПР-спектров осуществлялось при техническом содействии соавтора. Подготовка исследуемых образцов, анализ и интерпретация полученных данных выполнены автором диссертации самостоятельно.

2.3 Модельные липидсодержащие системы

2.3.1 Планарные БЛМ

Установка для получения планарной БЛМ состоит из цис- и транс- ячеек (рис. 2.3а). В экспериментах по изучению взаимодействия МНЧ с планарной БЛМ 10 мкл коллоидной суспензии МНЧ в концентрации 1 мг/мл в водном растворе при pH = 3,3 добавляли в цис-ячейку кюветы объёмом 2,5 мл, заполненную буферным раствором 5 мМ ТРИС-*HCl*, 5 мМ *KCl* при pH = 7,0–7,2. Присутствие раствора соли в системе было необходимо для измерения электрических характеристик мембраны (проводимость и пр.) в растворе электролита с целью контроля за состоянием мембраны. За транс-ячейкой кюветы располагался постоянный неодимовый магнит, поле которого обеспечивало локализацию МНЧ у мембраны. Зависимость магнитной индукции (мТл) и градиента индукции (мТл/мм), взятого со знаком минус, от расстояния между магнитом и мембраной представлена на рисунке 2.3б.

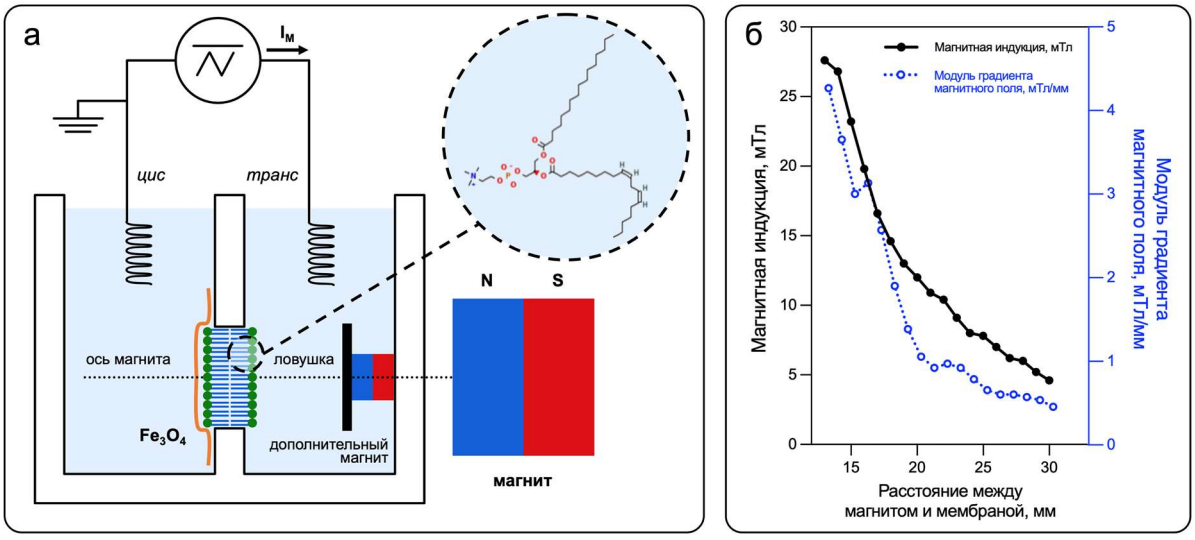


Рисунок 2.3 – Установка для исследования взаимодействия МНЧ с планарной БЛМ: а – схема установки; б – зависимости магнитной индукции (мТл) и модуля градиента магнитной индукции (мТл/мм) от расстояния между магнитом и мембраной (мм). По материалам [А5] с изменениями

В цис-ячейке кюветы был расположен заземленный электрод, в транс-ячейке кюветы располагался измерительный электрод. Ток через мембрану измеряли с помощью AgCl-электродов, подключенных к усилителю VA-10X (NPI Electronics GmbH, Германия) с сопротивлением обратной связи

5 ГОм и временем интегрирования 20 мс. Токи через мембрану оцифровывали с помощью 16-разрядного АЦП E14-440 (L-Card, Россия) с частотой дискретизации 1 кГц и подавали на компьютер, где проводили дальнейшую обработку сигнала [151]. Формирование БЛМ фиксировали путем контроля сопротивления и ёмкости мембраны. Мембрану формировали при комнатной температуре с помощью метода Мюллера из раствора смеси природных фосфолипидов азолектина (Avanti Polar Lipids, США) в декане концентрацией 25 мг/мл на отверстии 0,5 мм^2 в вертикальной стенке тефлоновой кюветы по методике [151,152]. Одним из основных компонентов азолектина является фосфатидилхолин. При физиологических значениях pH фосфатидилхолин является цвиттер-ионом – аминогруппа липида протонирована, фосфатная группа депротонирована. На стенке транс-ячейки кюветы располагался дополнительный магнит, изолированный парафильмом, на котором крепилась ловушка-подложка из кремния или слюды, предназначенная для улавливания МНЧ и их агрегатов в случае их прохождения через мембрану. Эксперименты по нанесению БЛМ проводились при техническом содействии соавторов при непосредственном участии автора. Подготовка исследуемых образцов, анализ и интерпретация полученных данных выполнены автором диссертации самостоятельно.

2.3.2 Ленгмюровские монослои

Ленгмюровские монослои были получены с помощью технологии Ленгмюра на установке KSV NIMA KN 1002 (KSV, Финляндия) с программным обеспечением, предоставленным производителем. На поверхность водной субфазы буфера наносили раствор липида в смеси хлороформа и этанола в мольном отношении 1 к 1, растекание которого приводило к формированию ленгмюровского монослоя. Для наблюдения за состоянием монослоя использовали весы Вильгельми, позволяющие отслеживать изменение поверхностного натяжения γ при изменении свободной площади поверхности монослоя A при смещении подвижных барьеров. Изотермы сжатия представляют собой зависимости поверхностного давления $\pi = \gamma_0 - \gamma$ (где γ_0 – поверхностное натяжение

чистой поверхности водной субфазы) от площади монослоя, полученные в изотермическом режиме. Их анализ позволяет количественно определять термодинамические параметры состояния плёнки.

Ленгмюровский монослой может быть перенесен с поверхности водной субфазы на твёрдую подложку из слюды и исследован методом АСМ. Схемы переноса, а также полученные методом АСМ характерные изображения монослоёв из азолектина, перенесённых на подложку слюды методом Ленгмюра-Шеффера и методом Ленгмюра-Блоджетт, представлены на рисунке 2.4.

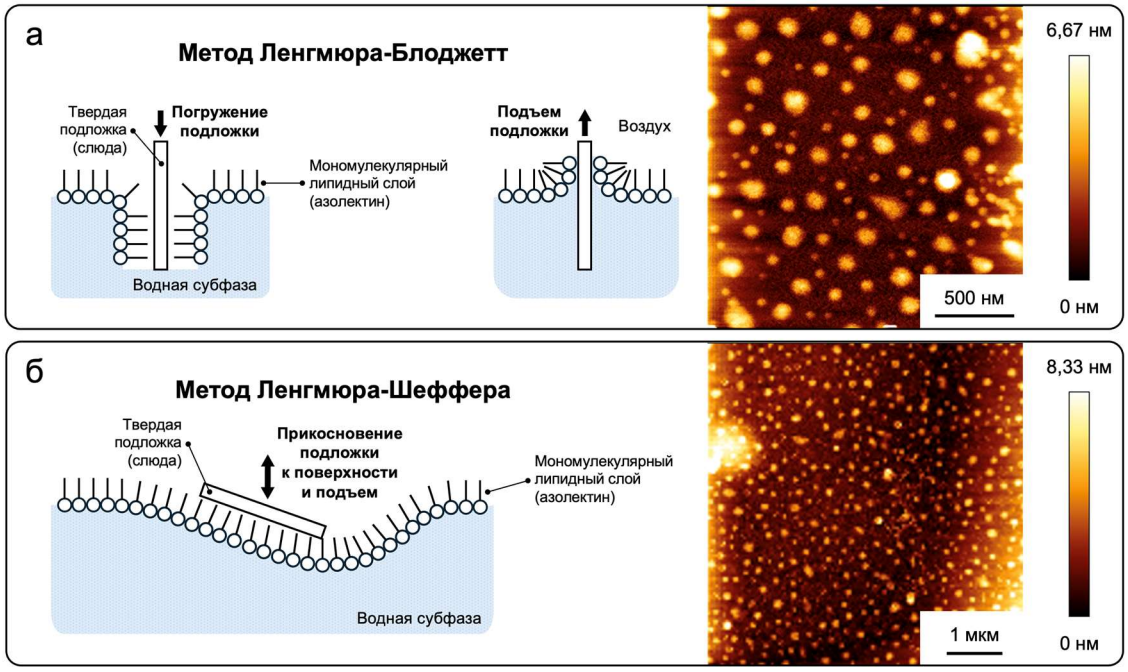


Рисунок 2.4 – Схемы переноса ленгмюровских монослоёв на твёрдую подложку из слюды и топографические АСМ-изображения монослоёв: а – метод Ленгмюра–Блоджетт; б – метод Ленгмюра–Шеффера

2.3.3 Липосомы

Липосомы получали методом гидратации тонкой липидной плёнки. Липиды предварительно растворяли в смеси этанола и хлороформа в массовом соотношении 1 к 1, после чего растворитель удаляли с помощью эвапоратора до образования липидной плёнки на дне круглодонной стеклянной колбы. Далее липидную плёнку гидратировали буферным раствором при перемешивании, в результате чего происходила самоорганизация фосфолипидов азолектина с образованием суспензии липосом. Для уменьшения размеров и снижения

полидисперсности липосом суспензию подвергали ультразвуковой обработке с помощью сонотрода в течение трёх минут.

2.4 Методы изучения взаимодействия коллоидных систем с клетками

Для изучения взаимодействия липосом, модифицированных β-КМЦД, с клетками использовались клеточные культуры ASC52telo/MSC и MDA-MB-231. Клетки выращивали при 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO_2. Клетки культивировали в среде DMEM (PanEco, Россия) с глюкозой, 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), а также смесь антибиотиков и антимикотиков (HyClone, США). Клетки пассировали при 70–80 % конфлюэнтности с использованием раствора Версена (ПанЭко, Россия) и раствора трипсина (ПанЭко, Россия), пересевали каждые 3–4 дня и поддерживали в фазе логарифмического роста для проведения экспериментов.

Для изучения взаимодействия коллоидов с клетками использовали метод конфокальной лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии, с помощью которого получали серию оптических срезов образца на различных глубинах (z-stack), на основании которых выполняли трёхмерную реконструкцию. Для проведения конфокальной z-stack микроскопии к клеткам добавляли флуоресцентный мембранный зонд 3,3′-дигексилоксакарбоцианина йодид ($DiOC_6$) в конечной концентрации 0,2 мкМ. $DiOC_6$ связывается с липидными мембранами клеток и обеспечивает их визуализацию, что позволяет сопоставлять пространственное распределение флуоресцентно меченных липосом с положением клеток. Для оценки состояния клеток после воздействия проводили окрашивание аннексином V.

Покадровую флуоресцентную съемку проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2, оснащенного объективом CFI Plan Fluor DL 10XF CH (10-кратное увеличение, NA 0,30; Nikon, Япония) и фотометрической камерой Kinetix sCMOS, с использованием набора фильтров возбуждения / эмиссии 475/570 нм. Для конфокальной визуализации были получены z-пакеты с шагом по оси 1 мкм в двух каналах флуоресценции вместе

с изображениями в проходящем свете. Для получения изображений использовалось программное обеспечение NIS-Elements AR (версия 5.40.02; Nikon, Япония). Коллоидные суспензии в концентрации 0,2 мг/мл добавляли к клеткам непосредственно перед получением изображения. Съёмка взаимодействия липосом и клеток проводилась с интервалом в 5 минут в течение первых 24 часов и с интервалом в 30 минут после этого. Видеозаписи анализировались с использованием программного обеспечения NIS-Elements (Nikon, Токио, Япония) и Fiji/ImageJ.

Для исследования методом проточной цитометрии клетки высевали в чашки Петри диаметром 30 мм. Через два дня клетки инкубировали с липосомами, промывали фосфатным буфером, отделяли от субстрата с помощью трипсина, центрифугировали, и осадок ресуспендировали в фосфатном буфере. Клеточную суспензию пропускали через сетчатый фильтр диаметром 45 мкм для удаления клеточных агрегатов. Проточную цитометрию проводили на приборе BD FACS Aria III (BD Biosciences, США) в двух каналах детектирования: возбуждение при 480 нм с детектированием флуоресценции при 530/30 нм и возбуждение при 633 нм с детектированием при 660/20 нм. Чтобы свести к минимуму повреждение клеток, использовали насадку диаметром 100 мкм при давлении 0,14 МПа со скоростью регистрации 1000–2000 событий в секунду.

Работа с клеточными линиями проводилась на базе Факультета фундаментальной медицины МГУ при техническом содействии соавторов. Эксперименты с клетками методами конфокальной флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии проводились при техническом содействии соавторов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Структурообразование в биоподобных коллоидных системах, содержащих противоположно заряженные компоненты

3.1.1 Формирование и свойства комплексов ПАК и спермина

Подраздел посвящён исследованию процессов формирования и структурообразования в биоподобных коллоидных системах при взаимодействии противоположно заряженных компонентов в объёмной водной фазе и на границе раздела фаз. В диссертации было исследовано взаимодействие биогенного полиамина спермина с анионными молекулами ПАК и изучена возможность создания полимерных комплексов на основе молекул ПАК молекулярных масс 2100 Да, 8000 Да, 15000 Да и молекул спермина, а также возможность включения в состав комплексов противоопухолевого препарата доксорубицина и железосодержащих МНЧ.

Из литературы известен подход к созданию полимерных комплексов на основе биогенных полианионов и катионных «сшивок» [153,154], в том числе возможность создания полимерных комплексов на основе ПАК с использованием молекул спермина в качестве структурного компонента [88,155]. При этом большой интерес представляет возможность создания полимерных комплексов на основе молекул ПАК относительно небольшой молекулярной массы для обеспечения их биосовместимости [156,157], а также возможность модификации комплексов биологически активными соединениями и МНЧ. Интерес к использованию молекул ПАК в качестве полимерной основы комплексов определяется их анионной природой и востребованностью в современной медицине [156,158].

Из литературы известна возможность образования коллоидных систем в результате связывания молекул ПАК молекулами низкомолекулярных олигокатионов благодаря электростатическому связыванию противоположно заряженных групп [159]. При этом возможность пространственного связывания молекулы длинного полиэлектролита более короткими противоположно

заряженными олигоэлектролитами с последующей компактизацией комплексов показана в результате моделирования подобных систем [160,161]. Предполагаемая структура комплексов представлена на рисунке 3.1А. Методом динамического светорассеяния были определены гидродинамические радиусы полимерных комплексов, методом электрофоретического светорассеяния были определены потенциалы полимерных комплексов при различных соотношениях $R = \frac{N_{зв}}{N_{сп}}$.между числом молекул спермина $N_{сп}$ и числом мономерных звеньев молекул ПАК $N_{зв}$ (рис. 3.1).

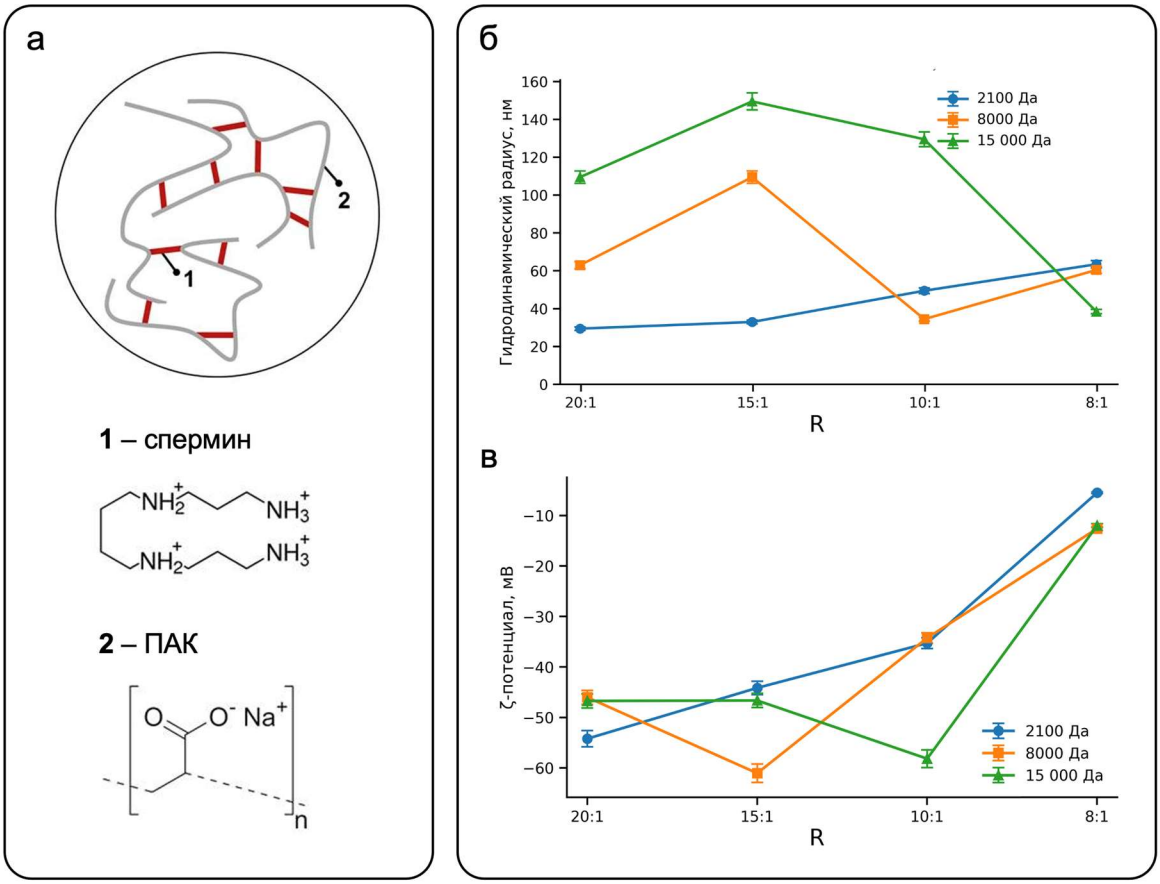


Рисунок 3.1 – Полимерные комплексы на основе ПАК и спермина: а – структура комплексов, формируемых за счёт электростатических «сшивок» между молекулами спермина и ПАК; б – гидродинамические радиусы поликомплексов; в – ζ-потенциалы поликомплексов. Для б и в приведены данные для ПАК с молекулярными массами 2100, 8000 и 15000 Да при различном отношении числа мономерных звеньев полимера к числу молекул спермина. По материалам [А1] с изменениями

Уменьшение модуля ζ-потенциала полимерных комплексов при увеличении в системе доли спермина указывает на электростатическую природу взаимодействия спермина с молекулами ПАК, что приводит

к образованию коллоидных полимерных комплексов с характерными гидродинамическими диаметрами 50-300 нм, величина которых зависит от молекулярной массы ПАК и отношения числа мономерных звеньев полимера к числу молекул спермина. При этом для ПАК 8000 Да и ПАК 15000 Да наибольшие среди измеренных гидродинамические радиусы наблюдались при соотношении $R = 15$ и составляли порядка 110 нм и 150 нм, соответственно, в то время как для ПАК 2100 Да размер комплексов достигал наибольших значений при соотношении 8:1, что может быть связано с необходимостью добавления большего количества спермина для образования полимерного комплекса с короткими полимерными цепями. При соотношении 8:1 наблюдается существенная компенсация ζ-потенциала всех систем, что приводит к снижению коллоидной стабильности комплексов, обусловленной их электростатическим отталкиванием. Таким образом, образование полимерного комплекса на основе молекул биогенного полиамина спермина и молекул ПАК обусловлено в первую очередь электростатическим взаимодействием между аминогруппами молекул спермина и карбоксильными группами молекул ПАК. Молекула спермина при физиологических условиях среды имеет 4 протонированные аминогруппы и линейно-вытянутую конформацию и при этом обладает конформационной подвижностью, что позволяет ей образовывать динамические связи с карбоксильными группами как одной молекулы полимера, так и связывать между собой несколько молекул полимера, выступая в роли межмолекулярной «сшивки».

Для дальнейших исследований комплексов было выбрано соотношение числа мономерных звеньев ПАК к числу молекул спермина 15:1, поскольку при данном соотношении наблюдается комплексообразование системы при сохранении системой значительного отрицательного ζ-потенциала и, следовательно, зарядовой коллоидной устойчивости. Методом АСМ были получены изображения полимерных комплексов 15:1, зафиксированных на слюде после высыхания (рис. 3.2).

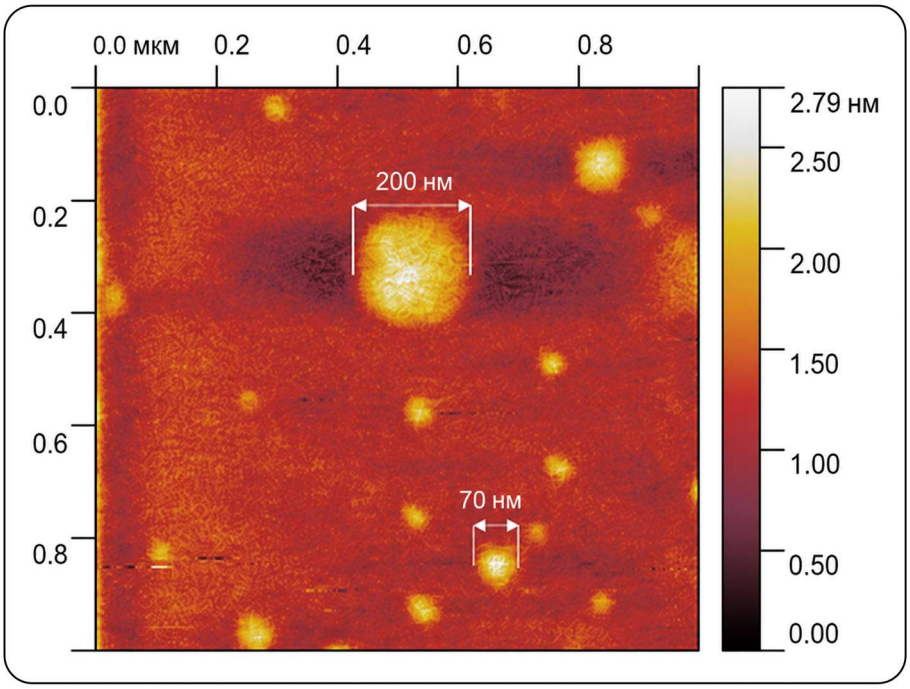


Рисунок 3.2 – Топографическое АСМ-изображение полимерных комплексов серии 15:1 на основе ПАК и спермина с молекулярной массой ПАК 2100 Да. По материалам [А1] с изменениями

По данным АСМ диаметры высушенных комплексов варьируются от 50 нм до 200 нм, что соответствует порядку величины гидродинамических радиусов коллоидов. Оценки изменений энергий при образовании полимерных комплексов ПАК и спермина рассмотрены в ПРИЛОЖЕНИИ А.

3.1.2 Включение противоопухолевого препарата доксорубицина и железосодержащих МНЧ в состав комплексов ПАК и спермина

В рамках диссертационной работы была продемонстрирована возможность включения в состав полимерных комплексов ПАК и спермина молекул противоопухолевого препарата доксорубицина, имеющего широкое применение в медицине [162], и железосодержащих МНЧ. Для установления включения молекул доксорубицина в полимерные комплексы коллоидные суспензии комплексов в присутствии препарата были проанализированы методом УФ-спектрофотометрии (рис. 3.3).

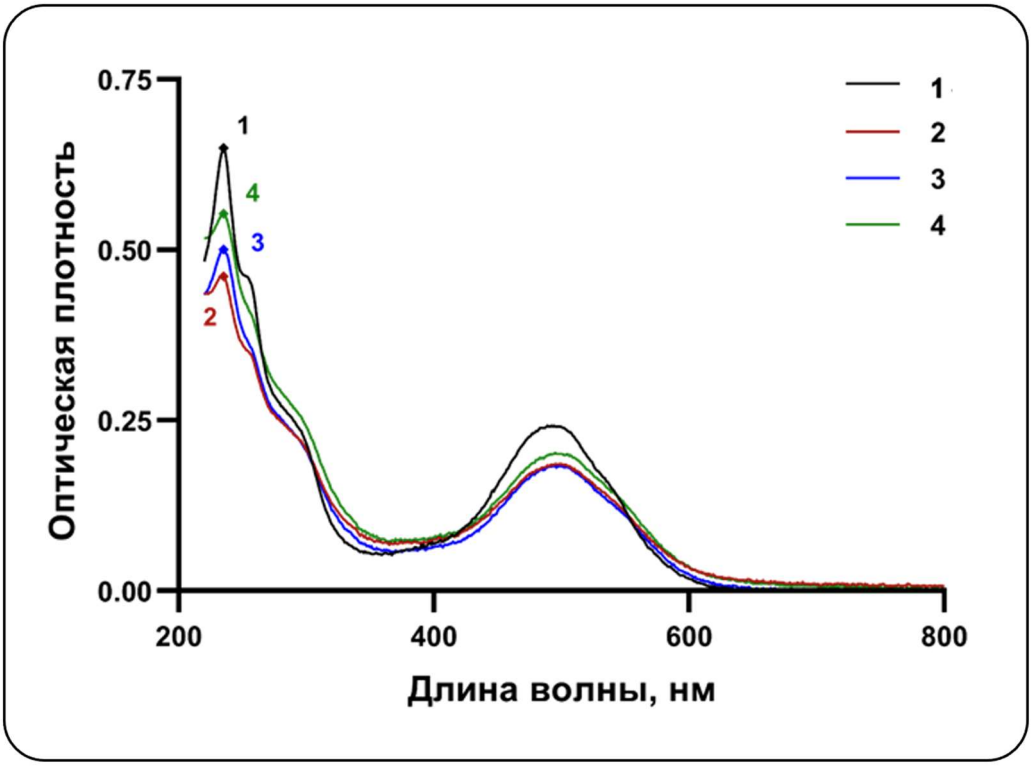


Рисунок 3.3 – УФ-спектры поглощения полимерных комплексов серии 15:1 на основе ПАК с молекулярными массами 2100 Да, 8000 Да, 15000 Да и спермина, а также водного раствора доксорубицина: (1) спектр водного раствора доксорубицина; (2) спектр коллоидной суспензии полимерных комплексов ПАК 2100 Да и спермина с доксорубицином; (3) спектр коллоидной суспензии полимерных комплексов ПАК 8000 Да и спермина с доксорубицином; (4) спектр коллоидной суспензии полимерных комплексов ПАК 15000 Да и спермина с доксорубицином. По материалам [А1] с изменениями

Для спектра молекул свободного доксорубицина в водной фазе характерны интенсивная полоса около 288–290 нм, широкая полоса в области 480–500 нм [163,164]. Области более коротких длин волн полосы ~233 нм и ~252 нм относят преимущественно к агликоновому фрагменту доксорубицина с вкладом протонированной при физиологических pH аминогруппы даунозаминового фрагмента, поэтому изменение поглощения в диапазоне 230–260 нм может быть связано с электростатическим взаимодействием протонированного даунозаминового фрагмента молекул доксорубицина с отрицательно заряженными карбоксилатными группами полимерной матрицы [164,165]. Наблюдаемые в полимерных комплексах ПАК и спермина изменения спектра в области 230–260 нм согласуются с изменением молекулярного окружения препарата при его связывании с полимерной фазой.

При этом из литературы известно, что молекулы доксорубицина способны образовывать димеры за счёт стэкинг-взаимодействий, что также сопровождается изменением формы спектра и проявляется при локализации доксорубицина в полимерной матрице [166]. После введения доксорубицина в состав коллоидной суспензии образцы диализировались для удаления несвязанного препарата, при этом анализ методом УФ-спектрофотометрии внешнего диализата показал отсутствие значимого количества свободного доксорубицина, что указывает на его эффективное включение в состав коллоидных комплексов [165]. В то же время спектры коллоидов после включения доксорубицина соответствуют характерным спектрам свободного доксорубицина с изменениями, вызванными изменением молекулярного окружения молекул доксорубицина при связывании с полимерной матрицей ПАК и спермина, что также указывает на включение доксорубицина в состав комплексов. Таким образом, результаты УФ-спектрофотометрии коллоидной суспензии комплексов и диализата позволяют установить включение доксорубицина в состав комплексов и предположить механизм иммобилизации, связанный с электростатическим взаимодействием протонированного даунозаминового фрагмента доксорубицина с карбоксильными группами ПАК. При этом можно предположить, что присутствие железосодержащих МНЧ в полимерной матрице также способно дополнительно координировать молекулы доксорубицина внутри полимерной матрицы.

Для обеспечения возможности локализации коллоидов в магнитном поле методом кластеризации внутри полимерных комплексов были синтезированы железосодержащие МНЧ. Предполагаемая схема функционализации полимерных комплексов МНЧ и молекулами доксорубицина представлена на рис.3.4а. Для определения природы магнитной фазы лиофилизованные из состояния коллоидной суспензии полимерные комплексы были исследованы методом ЭПР (рис. 3.4б).

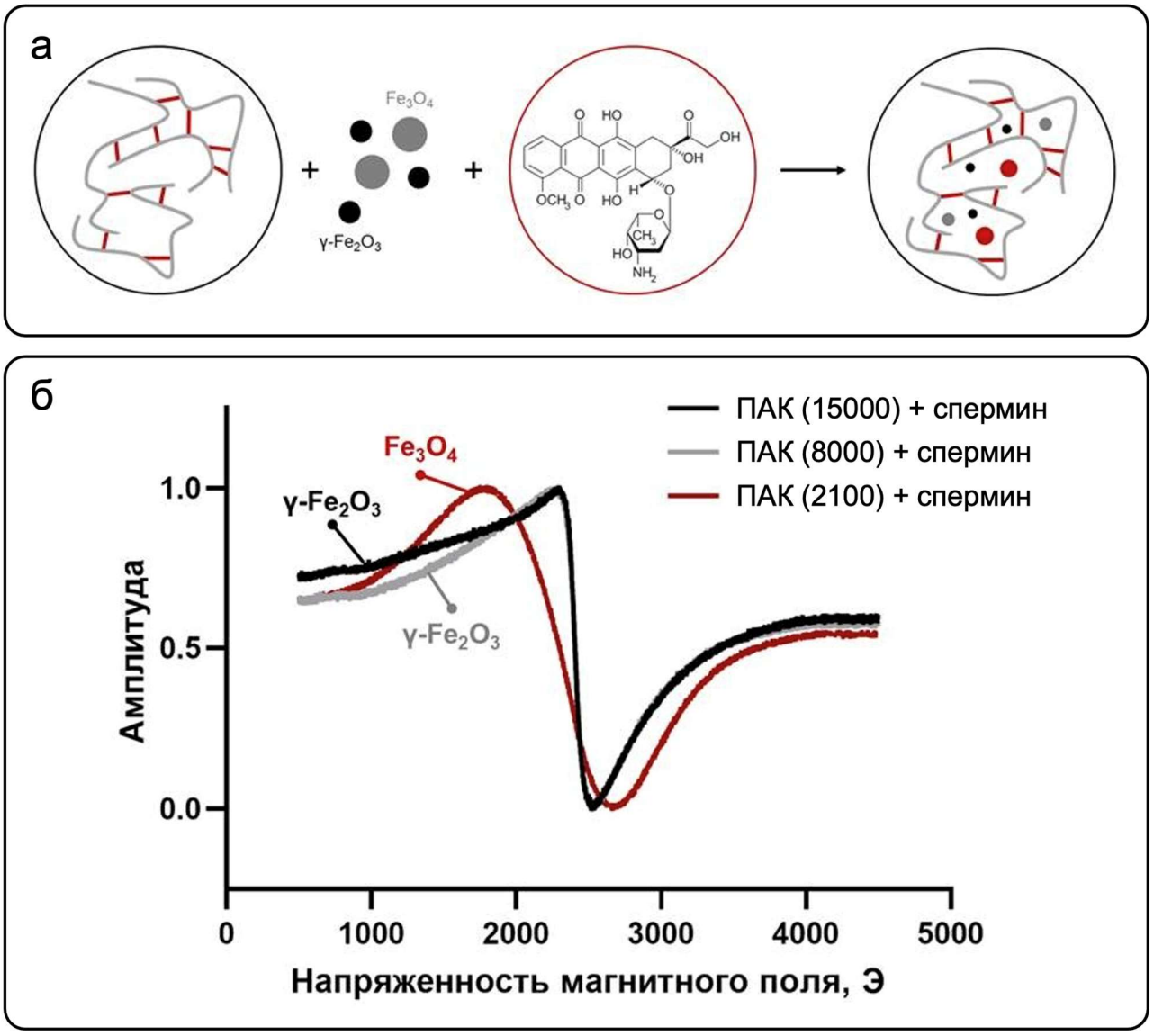


Рисунок 3.4 – Функционализация полимерных комплексов и характеризация магнитной фазы: а – схема функционализации полимерных комплексов МНЧ и молекулами доксорубицина; б – ЭПР-спектры полимерных комплексов серии 15:1, функционализованных железосодержащими МНЧ. На графике указаны предположительные типы МНЧ, образующиеся в полимерных комплексах, на основании данных [149, 150]. По материалам [А1] с изменениями

Сравнение полученных ЭПР-спектров с литературными данными указывает на образование железосодержащих МНЧ в составе полимерных комплексов [149,150]. При этом в образцах с 2100 Да можно предположить образование МНЧ магнетита Fe_3O_4, в то время как в комплексах с 8000 Да и 15000 Да можно предположить образование МНЧ маггемита γ-Fe_2O_3. Механизм формирования магнитной фазы в полимерных комплексах основан на протекании реакции восстановления ионов Fe^{2+} соли Мора гипофосфитом натрия в щелочной среде в присутствии кислорода воздуха. Координация ионов железа

с карбоксильными группами молекул ПАК и с аминогруппами молекул спермина определяет места пространственной локализации нуклеации МНЧ и стабилизирует уже сформированные МНЧ [165]. Таким образом, микрогелевая структура полимерных комплексов может выступать в качестве стабилизирующей матрицы, ограниченный объём ячеистой структуры которой определяет размер формируемых МНЧ [167]. Предполагаемая схема процесса формирования МНЧ представлена на рисунке 3.5.

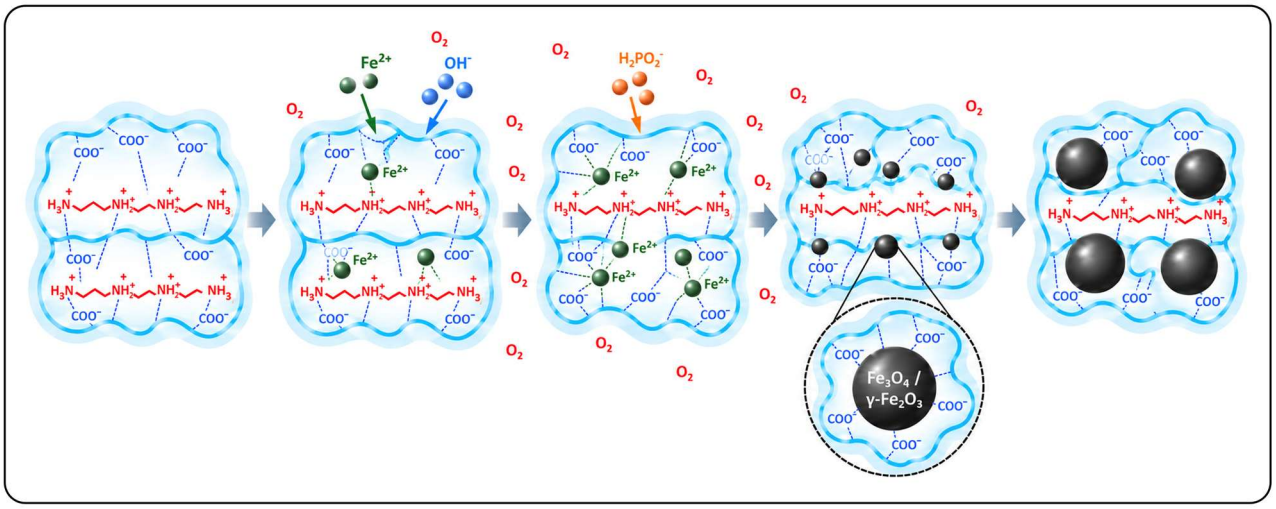


Рисунок 3.5 – Предполагаемая схема образования МНЧ внутри полимерной матрицы комплексов ПАК и спермина

Таким образом, в рамках диссертационной работы были получены полимерные комплексы на основе молекул ПАК с молекулярными массами 2100 Да, 8000 Да и 15000 Да и природного полиамина спермина, выполняющего функцию катионного структурообразующего компонента. На примере доксорубицина продемонстрирована возможность включения лекарственных соединений в состав поликомплексов. Кроме того, получены данные, указывающие на возможность включения в комплексы железосодержащих МНЧ, что создаёт предпосылки для дистанционного управления локализацией таких коллоидных систем в водной среде с использованием внешнего магнитного поля. Полученные полимерные композиты являются примером самоорганизующейся системы, параметры которой определяются параметрами самой системы. При этом механизмы, обуславливающие формирование полимерных комплексов ПАК и спермина, в первую очередь межкомпонентное взаимодействие противоположно

заряженных молекул, близки к механизмам, обуславливающим процессы компактизации ДНК, где спермин также выступает в качестве одного из ключевых компонентов. Процессы модификации полимерных комплексов могут быть рассмотрены с точки зрения взаимодействия молекул доксорубицина и МНЧ с локальной средой, отличающейся по свойствам и составу от окружающего водного раствора и близкой по свойствам к отдельной фазе – полиэлектролитным комплексам, что приводит к изменению структурной организации коллоидной системы при ключевой роли межкомпонентных и межфазных взаимодействий [168]. Понимание механизмов данных процессов может быть важно для объяснения макромолекулярного краудинга и процессов образования биомолекулярных конденсатов [169–171].

Основные результаты по исследованию комплексов ПАК и спермина опубликованы автором в соавторстве в работе [А1]. В работе [А1] автором получены исследуемые полимерные комплексы, выполнены измерения их гидродинамических размеров и электрокинетических характеристик, УФ-спектроскопические исследования, проведены эксперименты по включению доксорубицина и железосодержащих МНЧ в состав полимерных комплексов. Подготовка исследуемых образцов для ЭПР, анализ и интерпретация полученных данных выполнены автором диссертации самостоятельно. Кроме того, автор внёс существенный вклад в проведение исследований методом ЭПР.

3.1.3 Структурообразование при взаимодействии β-КМЦД с липидными ленгмюровскими монослоями

В рамках диссертационной работы изучались особенности физико-химических взаимодействий в коллоидных системах с молекулами β-КМЦД со степенью замещения 3 и липидными системами из смеси катионного липида ДОТАП и электронейтрального липида ДОФХ с мольной долей ДОТАП $x_{\text{ДОТАП}} = 0{,}3$. Было установлено, что молекулы β-КМЦД могут взаимодействовать с ленгмюровскими монослоями из смеси электронейтрального и катионного

липидов с образованием надмолекулярных структур высотой ~2 нм по данным АСМ.

Ранее соавторами были получены экспериментальные данные о возможности связывания молекул β-КМЦД с поверхностью липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов и получены данные, указывающие на возможность образования молекулами β-КМЦД агрегатов на поверхности бислоя [148,172]. Так, в процессе титрования коллоидной суспензии липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов молекулами β-КМЦД было установлено, что ЭФП липосом уменьшаются при увеличении в системе концентрации молекул β-КМЦД, что говорит о нейтрализации поверхностного заряда липосом в результате адсорбции молекул β-КМЦД на их поверхностях (рис. 3.6а). О преимущественно электростатической природе взаимодействия между β-КМЦД и поверхностью липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов говорит увеличение электропроводности системы, связанное с высвобождением противоионов депротонированных карбоксильных групп β-КМЦД и четвертичной аммониевой группы у молекул ДОТАП: Na^+ и Cl^- соответственно (рис. 3.6б).

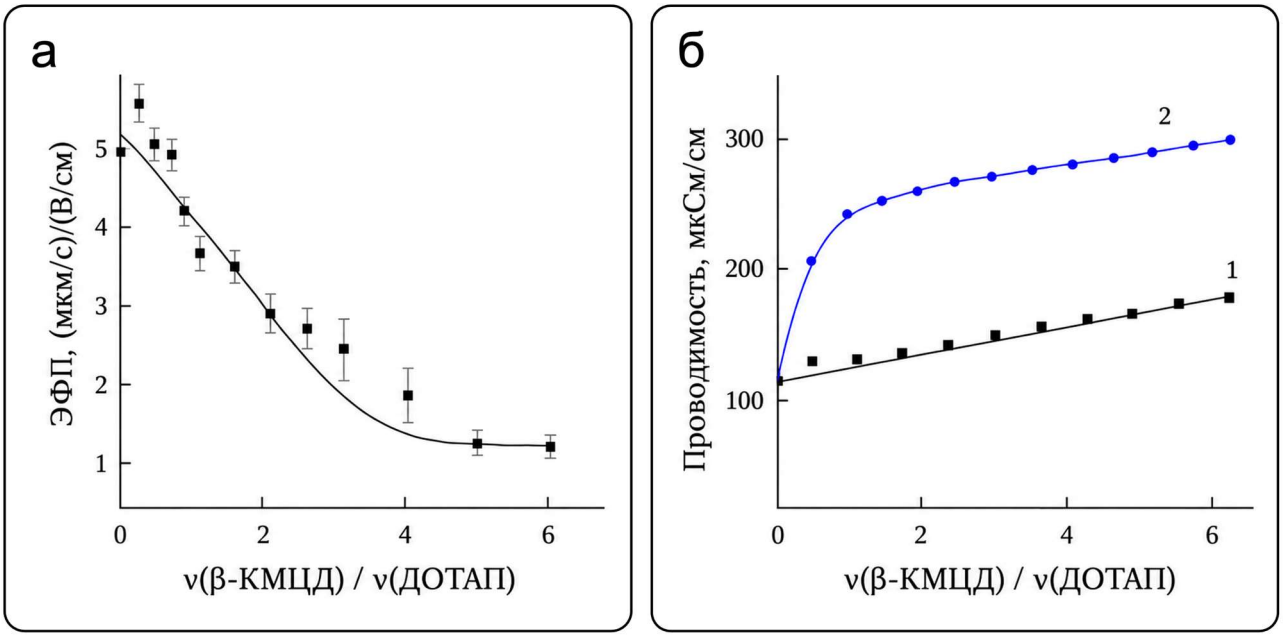


Рисунок 3.6 – Взаимодействие β-КМЦД с катионными липосомами: а – зависимость ЭФП липосом при хДОТАП = 0,3 от отношения числа молей β-КМЦД к числу молей ДОТАП в воде; б – зависимость электропроводности коллоидной суспензии липосом от отношения числа молей β-КМЦД к числу молей ДОТАП (кривая 2) и соответствующая зависимость для водного раствора β-КМЦД (кривая 1). Построено по данным, приведённым в работе соавторов [172]

Было установлено, что при соотношении 3–6 молекул β-КМЦД на 1 молекулу ДОТАП в мембране липосом при увеличении концентрации β-КМЦД значение ЭФП липосом перестаёт изменяться – кривая зависимости ЭФП от концентрации выходит на плато (рис. 3.6а). При этом совокупный потенциал системы остаётся положительным. При тех же соотношениях β-КМЦД электропроводность системы начинает изменяться линейно за счёт собственной электропроводности β-КМЦД (рис. 3.6б). Данные результаты могут указывать на возможность

β-КМЦД взаимодействовать с липосомами благодаря электростатическому связыванию с их поверхностью, а также о существовании концентрации β-КМЦД, при превышении которой взаимодействие β-КМЦД с поверхностью липосомы прекращается.

Для изучения характера адсорбции молекул β-КМЦД на поверхность липидсодержащих систем из смеси электронейтрального и катионного липидов было проведено исследование изотерм сжатия ленгмюровских монослоёв из смеси ДОТАП/ДОФХ в том же мольном соотношении, что и в мембранах липосом

($x_{ДОТАП}$ = 0,3), при включении в состав субфазы молекул β-КМЦД. На рисунке 3.7а представлены характерные изотермы сжатия ленгмюровских монослоёв, а также ленгмюровских монослоёв с включением в состав субфазы β-КМЦД. Липидные ленгмюровские монослои были перенесены с поверхности водной субфазы на твёрдую подложку из слюды методом Ленгмюра-Блоджетт и исследованы методом АСМ (рис. 3.7б, 3.7в).

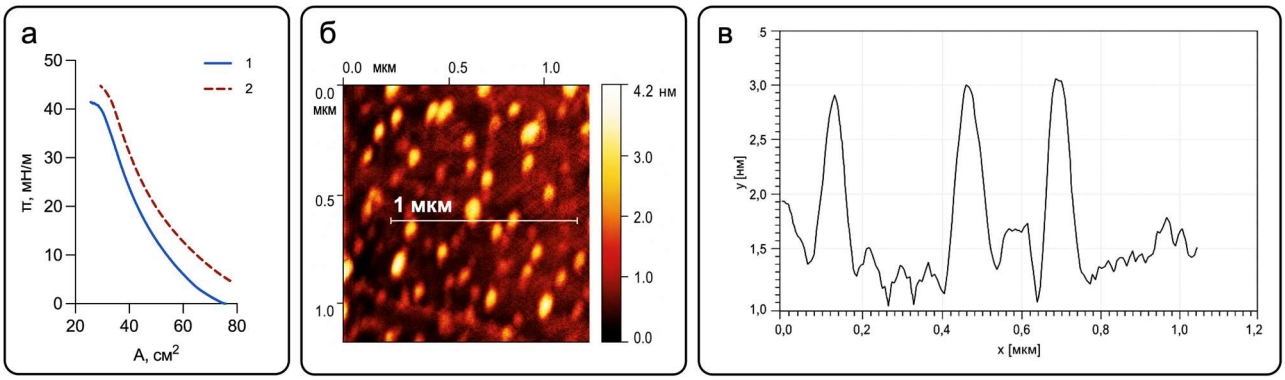


Рисунок 3.7 – Взаимодействие β-КМЦД с ленгмюровским монослоем из смеси электронейтрального и катионного липидов: а - изотермы сжатия монослоя без β-КМЦД (кривая 1) и при включении в субфазу β-КМЦД (кривая 2); б -топографическое АСМ-изображение поверхности монослоя с β-КМЦД после переноса на подложку; в – срез высот АСМ-изображения. По материалам [А2, А3] с изменениями

Присутствие в субфазе молекул β-КМЦД может приводить к изменению изотерм сжатия липидного ленгмюровского монослоя – изменению кривизны изотермы и увеличению поверхностного давления при фиксированной площади монослоя по сравнению с изотермой сжатия монослоя без включения в субфазу молекул β-КМЦД. Для количественной оценки различий изотерм сжатия был использован двухвыборочный критерий Колмогорова-Смирнова. При этом после достижения отношения числа молекул β-КМЦД к числу липидов 1 : 1, что приблизительно эквивалентно отношению 3 молекул β-КМЦД на 1 молекулу ДОТАП, дальнейшее увеличение концентрации молекул β-КМЦД в системе не приводило к заметному смещению изотермы сжатия ленгмюровского монослоя [А2], что может свидетельствовать о достижении насыщения адсорбции β-КМЦД на ленгмюровском монослое.

АСМ-исследование монослоёв, перенесённых на слюду методом Ленгмюра–Блоджетт, показало наличие образований высотой ~2 нм, рассматриваемых как

надмолекулярные структуры β-КМЦД (рис.3.7б, в). Поскольку высота надмолекулярных структур превышает размеры индивидуальных молекул β-КМЦД, составляющих порядка 0,7 нм [24], можно предположить, что надмолекулярные структуры представляют собой «стопки», состоящие из нескольких молекул β-КМЦД. Совокупность экспериментальных данных указывает на ключевую роль электростатического взаимодействия при взаимодействии молекул β-КМЦД с катионными липидами ленгмюровского монослоя. Оценки изменений энергий, определяющих формирование надмолекулярных структур β-КМЦД на поверхности липидсодержащих систем представлены в ПРИЛОЖЕНИИ Б. Возможность формирования молекулами β-КМЦД организованных надмолекулярных структур как на поверхности липидных бислоёв [148,172], так и на поверхности планарных липидных систем указывает на ключевую роль поверхности липидсодержащей системы в процессах изменения структурной организации системы, сопровождающихся образованием надмолекулярных структур молекулами β-КМЦД. Таким образом, показано, что присутствие в биоподобной коллоидной системе границы раздела фаз может обеспечивать изменение структурной организации коллоидной системы. Механизмы, определяющие процессы образования надмолекулярных структур из молекул β-КМЦД на поверхности планарных липидных систем, могут проявлять особенности, определяющие процессы сборки макромолекул и надмолекулярных структур, в том числе белков, на эндоплазматическом ретикулуме и на клеточной мембране [173–175]. Результаты, представленные в первом подразделе, выявляют ключевую роль электростатических взаимодействий противоположно заряженных компонентов в объёмной водной фазе и на границе раздела фаз в процессах структурообразования исследованных биоподобных коллоидных систем. Основные результаты исследования взаимодействия β-КМЦД с ленгмюровскими монослоями опубликованы автором в соавторстве в работах [А2,А3]. В работах [А2,А3] автором проведены эксперименты с ленгмюровскими липидными монослоями. В работе [А2] автором дополнительно осуществлён

перенос плёнок методом Ленгмюра-Блоджетт. Кроме того, автор внёс существенный вклад в проведение исследований методом АСМ.

3.2 Взаимодействие липосом, модифицированных β-КМЦД, с липидсодержащими системами

3.2.1 Экспериментальное исследование связывания липосом, модифицированных β-КМЦД, с липидсодержащими системами

В данном подразделе представлены результаты исследования взаимодействия многокомпонентных биоподобных коллоидных систем на основе липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, с рядом липидсодержащих систем. Для изучения были выбраны липосомы из смеси электронейтрального липида ДОФХ и катионного липида ДОТАП при $x_{\text{ДОТАП}} = 0{,}3$, модифицированные β-КМЦД, при отношении числа молей β-КМЦД к числу молей ДОТАП 2,5 к 1, поскольку в указанном диапазоне наблюдается формирование стопок на поверхности липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов при сохранении липосомами положительного потенциала поверхности. Методом проточной цитометрии было исследовано взаимодействие исходных липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов и липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, с клетками линий ASC52telo/MSC и MDA-MB-231 – мезенхимальных стволовых клеток и клеток эпителиального рака молочной железы человека соответственно. На рисунке 3.8 представлены нормированные гистограммы распределения клеточных событий по интенсивности флуоресценции. Были рассмотрены три группы: «контроль» – клетки без добавления коллоидов, «липосомы» – липосомы, «липосомы с β-КМЦД» – липосомы, модифицированные β-КМЦД. Под событием понимается одно зарегистрированное прохождение флуоресцирующей частицы через зону детекции цитометра.

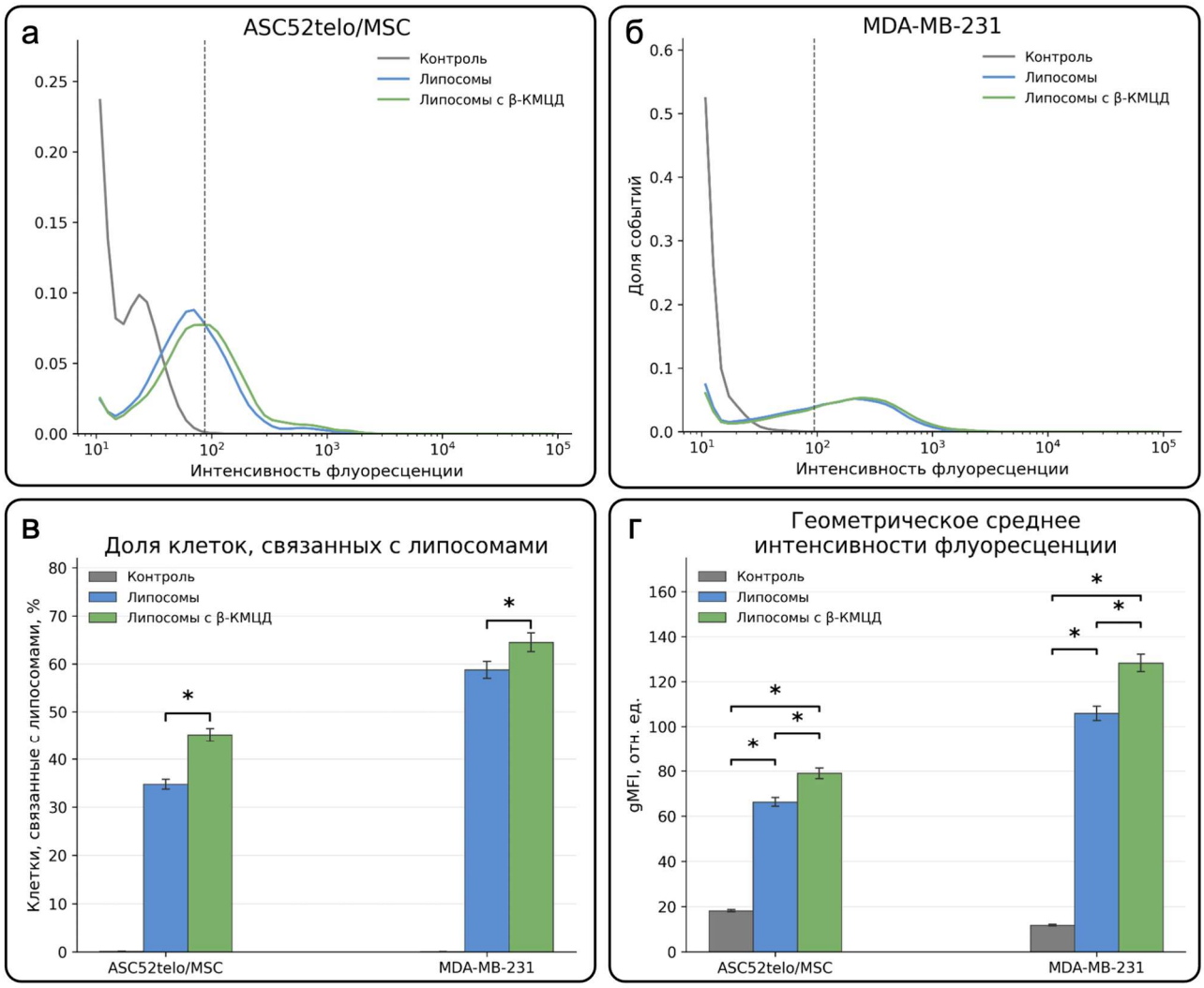


Рисунок 3.8 – Анализ клеточно-ассоциированной флуоресценции методом проточной цитометрии для клеток ASC52telo/MSC и MDA-MB-231:
(а, б) – нормированные гистограммы распределения событий по интенсивности флуоресценции; пунктирной линией показан порог, заданный по контрольному образцу;
(в, г) – доля клеток, ассоциированных с липосомами, и геометрическое среднее интенсивности флуоресценции для контрольных клеток, клеток после инкубации с катионными липосомами и липосомами, модифицированными β-КМЦД. Символом (*) показано статистически значимое различие (p-value < 0,05) согласно критерию χ^2 Пирсона для доли клеток, ассоциированных с липосомами, и согласно двустороннему критерию Манна-Уитни для геометрического среднего интенсивности флуоресценции с учётом поправки Бонферрони. По материалам [А4] с изменениями

Результаты проточной цитометрии были использованы для оценки доли клеток, ассоциированных с липосомами. Учитывали события, для которых интенсивность сигнала превышала пороговую интенсивность, соответствующую контрольному сигналу клеточной автофлуоресценции. В анализе использовали одинаковое число клеточных событий внутри выбранных популяций.

В контрольных образцах доля событий выше порога была минимальной и составляла менее 0,5 %. Для ASC52telo/MSC доля клеток, ассоциированных/связанных с липосомами, увеличивалась с 35 % для исходных липосом до 45 % для липосом, модифицированных β-КМЦД. Для MDA-MB-231 соответствующая доля увеличивалась с 59 % до 65 %. Таким образом, абсолютная доля клеток, ассоциированных с липосомами, была выше для MDA-MB-231, тогда как изменение в связывании с клетками после модификации липосом β-КМЦД было сильнее выражено для ASC52telo/MSC. Геометрическое среднее интенсивности флуоресценции (gMFI, geometric mean fluorescence intensity) также возрастало для липосом, модифицированных β-КМЦД: отношение gMFI для модифицированных и исходных липосом составляло ~1,2 для обеих клеточных линий. Рост gMFI указывает на увеличение интенсивности клеточно-ассоциированной флуоресценции и может быть связан с увеличением количества липосом, ассоциированных с отдельной клеткой. Статистическую значимость различий доли клеток, связанных с липосомами, оценивали с использованием критерия χ^2 Пирсона. Попарные сравнения геометрического среднего интенсивности флуоресценции выполняли с использованием двустороннего критерия Манна-Уитни. Для коррекции уровня значимости при множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони. Полученные результаты указывают на взаимодействие липосом с клетками обеих линий. Для систем с липосомами, модифицированными β-КМЦД, по сравнению с системами с немодифицированными липосомами возрастали как доля клеток, ассоциированных с липосомами, так и предполагаемое число коллоидов, ассоциированных с отдельными клетками. Для дополнительного изучения взаимодействия липосом с клетками ASC52telo/MSC и MDA-MB-231 было проведено исследование методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (рис. 3.9).

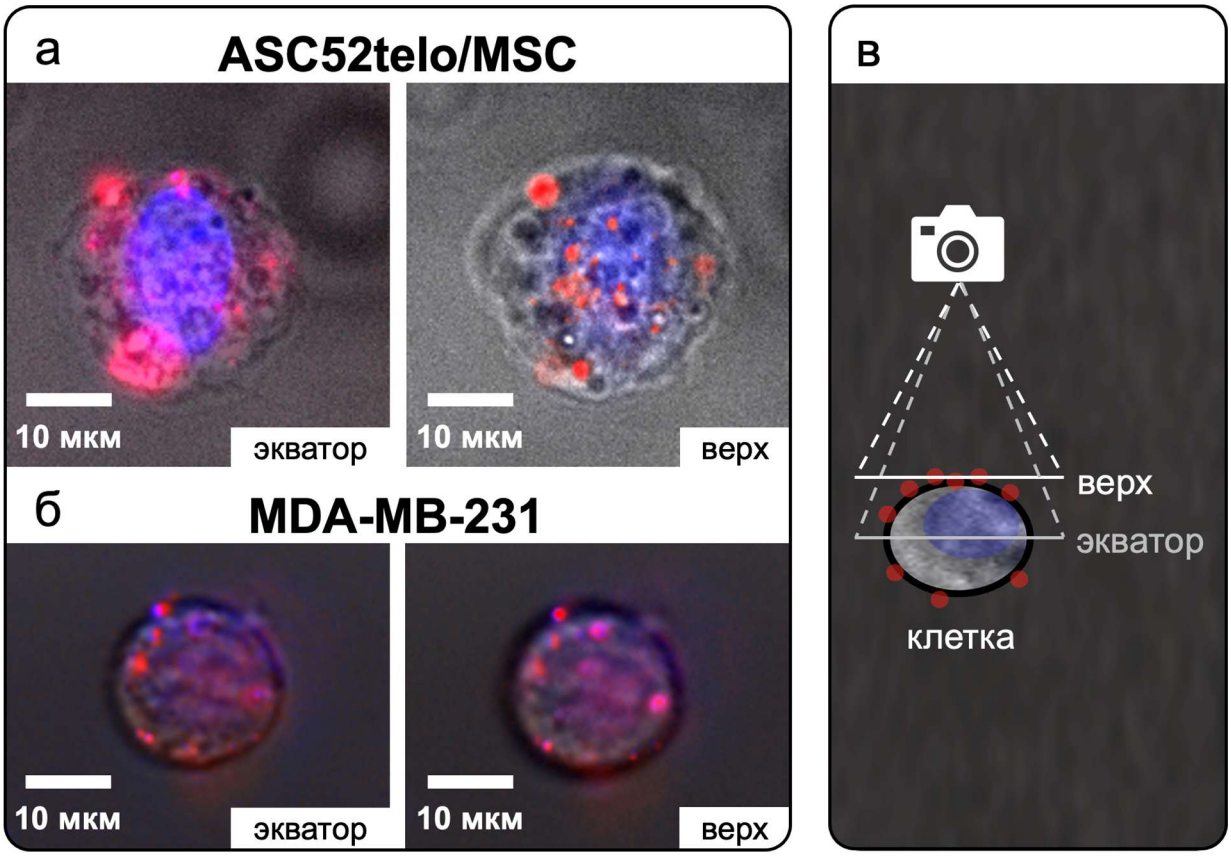


Рисунок 3.9 – Конфокальная микроскопия клеток ASC52telo/MSC (а) и MDA-MB-231 (б) после инкубации с липосомами, модифицированными β-КМЦД и флуоресцентно меченными Atto 488; в – схема экваториального и верхнего оптических срезов, показанных для обеих линий. Atto 488 – красный сигнал, DiOC6 – синий; проходящий свет – серый. Масштаб – 10 мкм. Максимумы поглощения и флуоресценции: DiOC6 – 484 и 501 нм, Atto 488 – 499 и 520 нм. По материалам [А4] с изменениями

Для обеих клеточных линий были выявлены локальные области клеточно-ассоциированного флуоресцентного сигнала. Для ASC52telo/MSC сигнал преимущественно был локализован вблизи видимой границы клетки и в перицеллюлярной области. Для MDA-MB-231 сигнал в большей степени был локализован в области видимого объёма клетки, что особенно было выражено в образцах с клетками, к которым добавлялись липосомы, модифицированные β-КМЦД. Для уточнения характера взаимодействия систем с клетками на более длительном временном масштабе систему исследовали методом покадровой флуоресцентной микроскопии. Этот подход позволил проследить динамику формирования клеточно-ассоциированного флуоресцентного сигнала после добавления липосом и сопоставить поведение немодифицированных липосом и липосом, модифицированных β-КМЦД. На рисунке 3.10а и рис. 3.10б

представлены данные покадровой флуоресцентной микроскопии клеток линий ASC52telo/MSC и MDA-MB-231, инкубированных с липосомами, модифицированными β-КМЦД. Левая часть каждого изображения соответствует оптическому каналу, правая – каналу флуоресцентной метки. Флуоресцентный сигнал наблюдался не как равномерное свечение, а как дискретные яркие области. Размеры индивидуальных липосом меньше пространственного разрешения использованной микроскопической системы, поэтому отдельная яркая область может соответствовать агрегатам флуоресцентно меченых коллоидных частиц.

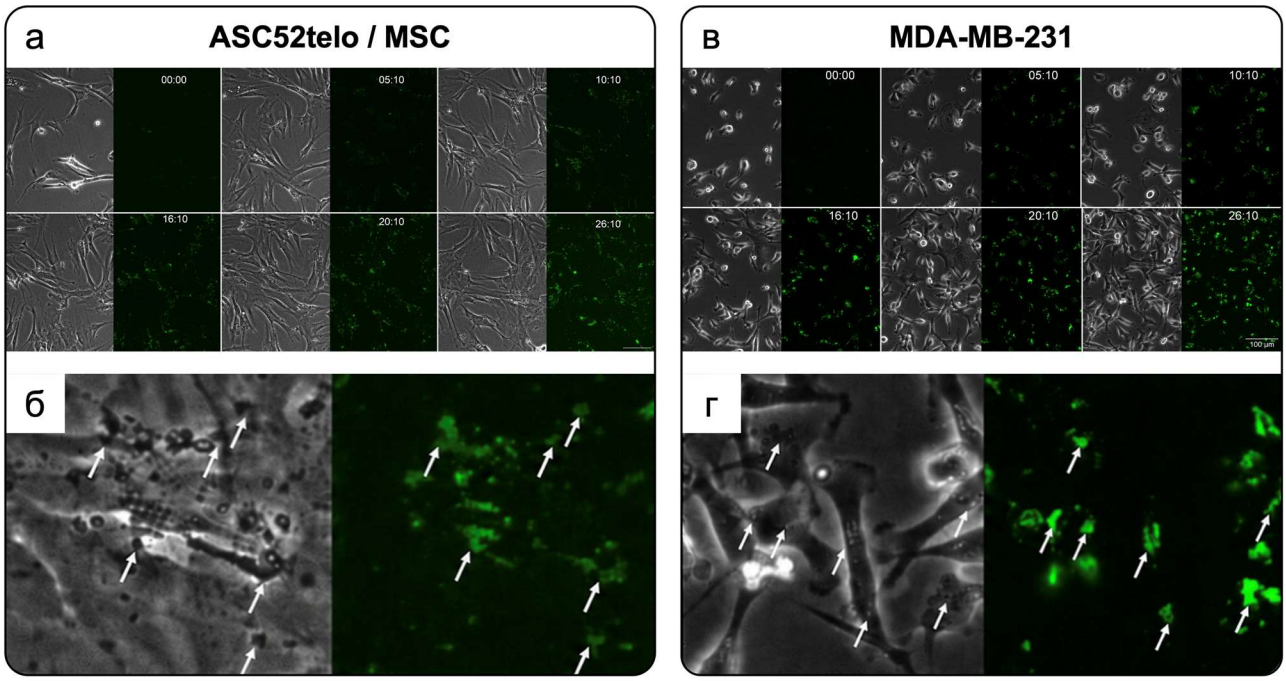


Рисунок 3.10 – Покадровая флуоресцентная микроскопия клеток ASC52telo/MSC и MDA-MB-231 после добавления липосом, модифицированных β-КМЦД.
(а, в) Временные последовательности изображений; (б, г) Увеличенные области, показывающие преимущественно периферическое расположение флуоресцентного сигнала для ASC52telo/MSC и его более выраженную сопряжённость с клетками MDA-MB-231. Стрелками отмечены характерные локальные области флуоресцентного сигнала. По материалам [А4] с изменениями

Для ASC52telo/MSC флуоресцирующие объекты преимущественно располагались по периферии клеток и были слабее сопряжены с перемещением клеток. Наблюдение за отдельными клетками в двух каналах показало, что изменение их положения и ориентации в течение времени наблюдения происходило независимо от положения флуоресцирующих объектов. Для MDA-MB-231 положение флуоресцирующих агрегатов изменялось

в соответствии с изменением ориентации и положения клеток, что может указывать на более устойчивое поверхностное связывание и/или локализацию флуоресцирующих коллоидов преимущественно во внутренней области клеток.

Таким образом, было установлено, что коллоиды обоих типов взаимодействуют с клетками линий ASC52telo/MSC и MDA-MB-231. Модификация липосомы молекулами β-КМЦД увеличивала интенсивность клеточно-ассоциированной флуоресценции, что может указывать на увеличение доли клеток, ассоциированных с липосомами. При этом данные флуоресцентной микроскопии указывают на различие в пространственной локализации коллоидов в системах с клетками различных типов. Работа с клеточными линиями проводилась на базе Факультета фундаментальной медицины МГУ при техническом содействии соавторов.

Изучение взаимодействия липосом, модифицированных β-КМЦД, с анионными ленгмюровскими монослоями из азолектина, использованных в качестве моделей поверхности клеточной мембраны, позволило предложить механизмы взаимодействия липосом с поверхностью липидсодержащих систем, объясняющие эффект усиления связывания для модифицированных липосом по сравнению с немодифицированными липосомами. На рисунке 3.11 представлены изотермы сжатия (рис. 3.11а) и зависимости модуля сжатия C_s^{-1} от поверхностного давления (рис. 3.11б) для монослоя азолектина без добавок, монослоя азолектина на субфазе с β-КМЦД, для монослоя азолектина на субфазе с немодифицированными липосомами и для монослоя азолектина на субфазе с липосомами, модифицированными β-КМЦД, а также предполагаемые схемы взаимодействия коллоидов с липидными монослоями и поверхностью клеточной мембраны (рис. 3.11в,г).

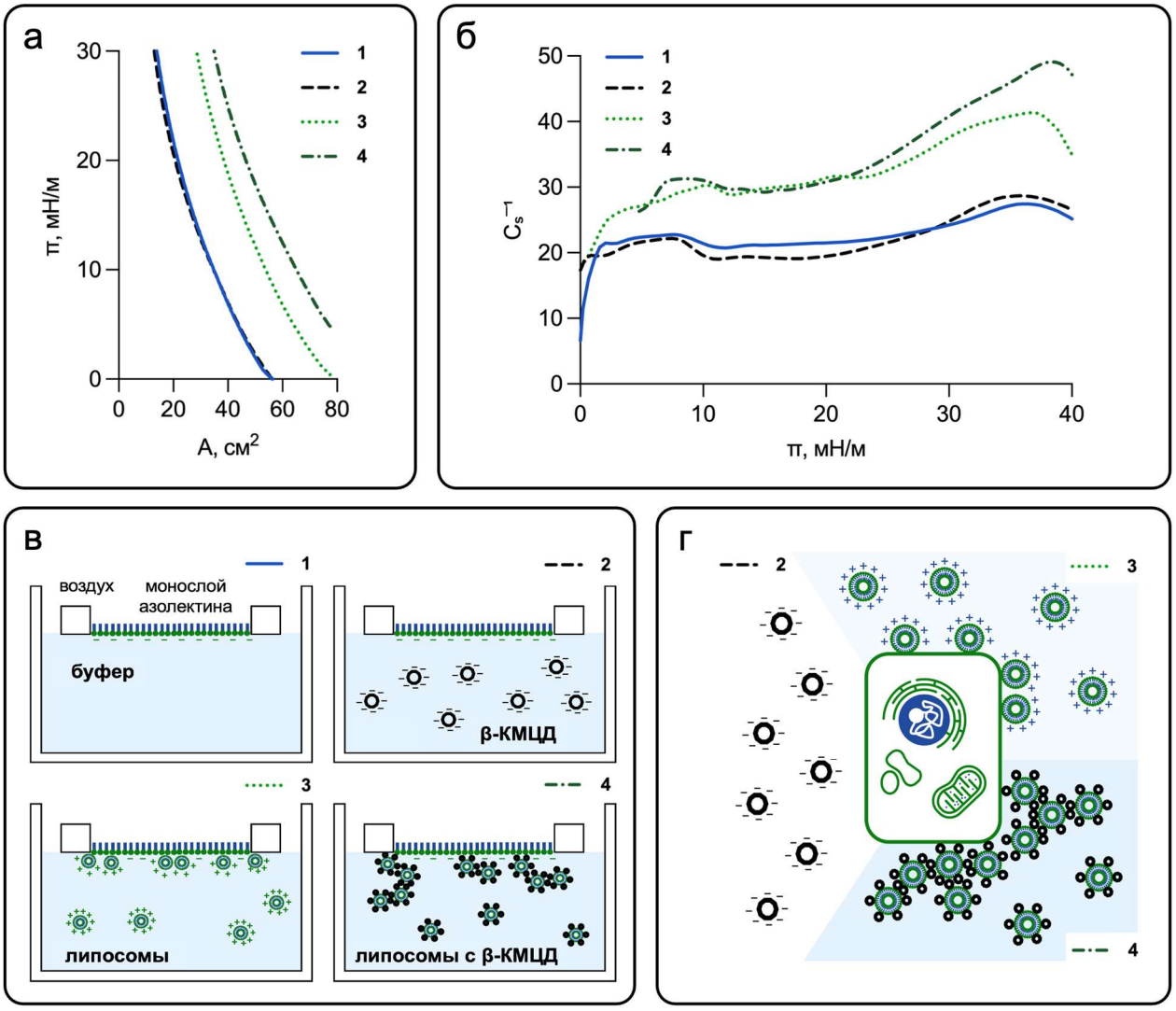


Рисунок 3.11 – Взаимодействие β-КМЦД и липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов с монослоем азолектина: а – изотермы сжатия монослоя без добавок (1), с β-КМЦД (2), немодифицированными липосомами (3) и липосомами, модифицированными β-КМЦД (4) ; б – модуль сжатия монослоя без добавок (1), с β-КМЦД (2), немодифицированными липосомами (3) и липосомами, модифицированными β-КМЦД (4); в – предполагаемая схема взаимодействий коллоидов с монослоем; г - предполагаемая схема взаимодействий коллоидов с клеточной мембраной. По материалам [А3] с изменениями

Добавление в субфазу β-КМЦД не вызывало измеримого смещения изотермы сжатия монослоя азолектина, что свидетельствует об отсутствии заметной адсорбции β-КМЦД на границе раздела фаз и может быть связано с электростатическим отталкиванием отрицательно заряженных молекул β-КМЦД от анионных компонентов монослоя. В присутствии липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов изотермы смещались в область более высоких поверхностных давлений при заданной площади, причём наиболее

выраженный эффект наблюдался для липосом, модифицированных β-КМЦД. Различие между изотермами монослоя азолектина и монослоя в присутствии липосом и липосом, модифицированных β-КМЦД, дополнительно оценивали двухвыборочным критерием Колмогорова-Смирнова. Различались как распределения поверхностного давления в общем диапазоне площадей, так и распределения значений модуля сжатия в общем диапазоне поверхностных давлений (p-value < 0,05). Наблюдаемые изменения согласуются с адсорбцией липосом на монослое и увеличением его сопротивления латеральному сжатию. Более выраженный эффект адсорбции липосом, модифицированных β-КМЦД, на монослое азолектина может быть обусловлен увеличением количества адсорбированных частиц и/или их эффективной площади на границе раздела фаз.

3.2.2 Предполагаемый механизм взаимодействия липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, с рядом липидсодержащих систем

Для качественной оценки энергий связывания липосом, модифицированных β-КМЦД, с липидсодержащими системами локальный контакт липосомы с мембраной можно рассматривать как взаимодействие двух квазиплоских заряженных поверхностей в электролите. В линейном приближении Дебая–Хюккеля масштаб электростатического вклада в свободную энергию взаимодействия можно представить в виде:

$$\Delta G_{эл} \sim \frac{\sigma_{лип}\sigma_{мем}\lambda_{Д}}{\varepsilon_{В}\varepsilon_{0}} A_{конт} \exp\left(-\frac{D}{\lambda_{Д}}\right), \qquad (3.1)$$

где $\sigma_{лип}$ и $\sigma_{мем}$ – поверхностные плотности заряда липосомы и мембраны соответственно; $A_{конт}$ – эффективная площадь контакта; D – расстояние между взаимодействующими поверхностями. При $\sigma_{лип} > 0$ и $\sigma_{мем} < 0$ значение $\Delta G_{эл} < 0$, что соответствует электростатическому притяжению.

Поверхностный заряд коллоида в используемом приближении будем считать пропорциональным ЭФП липосом. Тогда отношение поверхностных зарядов можно оценить через отношение ЭФП:

$$\frac{\sigma_{\text{β-КМЦД-лип}}}{\sigma_{\text{лип}}} \approx \frac{\mu_{\text{β-КМЦД-лип}}}{\mu_{\text{лип}}} \approx \frac{1{,}3}{5{,}5} \approx 0{,}24, \qquad (3.2)$$

где $\sigma_{\text{β-КМЦД-лип}}$ и $\sigma_{\text{лип}}$ – эффективные поверхностные плотности заряда липосомы, модифицированной β-КМЦД, и немодифицированной липосомы; $\mu_{\text{β-КМЦД-лип}}$ и $\mu_{\text{лип}}$ – ЭФП соответствующих систем. С учётом возможного изменения эффективной площади контакта отношение электростатических вкладов можно записать как:

$$\frac{\Delta G_{\text{эл}}^{\text{β-КМЦД-лип}}}{\Delta G_{\text{эл}}^{\text{лип}}} \approx \frac{\sigma_{\text{β-КМЦД-лип}}}{\sigma_{\text{лип}}} \frac{A_{\text{конт}}^{\text{β-КМЦД-лип}}}{A_{\text{конт}}^{\text{лип}}}, \qquad \frac{A_{\text{конт}}^{\text{β-КМЦД-лип}}}{A_{\text{конт}}^{\text{лип}}} \gtrsim \frac{1}{0{,}24} \approx 4{,}2. \qquad (3.3)$$

Исходя из оценки, можно предположить, что, если бы изменение взаимодействия определялось только электростатическим вкладом, для его полной компенсации площадь контакта должна была бы увеличиться ~ в 4 раза.

Оценим возможное увеличение площади контакта липосомы с липидсодержащей поверхностью в результате формирования молекулами β-КМЦД надмолекулярных структур. Пусть $f_{\text{осн}}$ – доля площади поверхности, занятая основаниями β-КМЦД-стопок, $n_{\text{ДОТАП}}$ – число молекул ДОТАП в кластере, m – число уровней β-КМЦД в «стопке». Тогда:

$$f_{\text{осн}} = \frac{f_{\text{связ}} \nu A_{\text{β-КМЦД}}}{n_{\text{ДОТАП}} A_{\text{ДОТАП}}} \approx \frac{0{,}46}{n_{\text{ДОТАП}}}, \qquad (3.4)$$

где $f_{\text{связ}}$ – доля связанных молекул β-КМЦД, ν – используемый стехиометрический коэффициент, $A_{\text{β-КМЦД}}$ и $A_{\text{ДОТАП}}$ – проекционные площади молекул β-КМЦД и ДОТАП соответственно. Пусть m – число молекулярных уровней β-КМЦД в стопке.

Поскольку проекционная площадь одной молекулы β-КМЦД примерно в два раза превышает площадь, приходящуюся на одну молекулу ДОТАП, относительное увеличение эффективной площади контакта можно оценить как:

$$\frac{A_{\text{конт}}^{\text{β-КМЦД-лип}}}{A_{\text{конт}}^{\text{лип}}} = 1 - f_{\text{осн}} + m f_{\text{осн}} = 1 + (m-1) f_{\text{осн}} \approx 1 + (m-1) \frac{0{,}46}{n_{\text{ДОТАП}}}. \qquad (3.5)$$

При оценке $m = 3$ и $n_{\text{ДОТАП}} = 3$: $\frac{A^{\text{β-КМЦД-лип}}_{\text{конт}}}{A^{\text{лип}}_{\text{конт}}} \approx 1{,}3$; при $n_{\text{ДОТАП}} = 2$: $\frac{A^{\text{β-КМЦД-лип}}_{\text{конт}}}{A^{\text{лип}}_{\text{конт}}} \approx 1{,}5$; при $n_{\text{ДОТАП}} = 1$: $\frac{A^{\text{β-КМЦД-лип}}_{\text{конт}}}{A^{\text{лип}}_{\text{конт}}} \approx 1{,}9$. Таким образом, увеличение геометрической площади контакта в рамках использованных предположений не может полностью компенсировать уменьшение модуля электростатического вклада. Это указывает на необходимость учитывать дополнительные механизмы взаимодействия липосом, модифицированных β-КМЦД, с липидсодержащими системами. Для двух одноимённо заряженных липосом потенциальный барьер, препятствующий их сближению, в значительной степени определяется электростатическим отталкиванием и в порядковой оценке пропорционален квадрату эффективного поверхностного заряда:

$$U_{\text{отт}} \propto \sigma^2_{\text{кол}} A_{\text{конт}} \exp(-\kappa D), \tag{3.6}$$

где $\sigma_{\text{кол}}$ – эффективная поверхностная плотность заряда коллоида.

$$\frac{U^{\text{β-КМЦД-лип}}_{\text{отт}}}{U^{\text{лип}}_{\text{отт}}} \approx \left(\frac{\sigma_{\text{β-КМЦД-лип}}}{\sigma_{\text{лип}}}\right)^2 \approx 0{,}24^2 \approx 0{,}06. \tag{3.7}$$

Таким образом, в рамках приближений расчётный барьер отталкивания между липосомами, модифицированными β-КМЦД, уменьшается в 17 раз по сравнению с барьером для немодифицированных липосом. Снижение отталкивания между коллоидами может облегчать удержание приближающейся липосомы вблизи адсорбированной на поверхности липидсодержащей системы липосомы и тем самым способствовать удержанию коллоидов. При этом из литературы известно, что несмотря на то, что электростатическое отталкивание между одноименно заряженными липидами препятствует тепловому образованию кластеров в смесях липидов [176], в присутствии заряженных молекул липиды могут начать упорядочиваться в кластеры [177–179]. Поэтому с учётом того, что липиды жидкокристаллической мембраны липосомы также могут перемещаться, в рамках предлагаемой модели можно предположить возможное латеральное перераспределение липидов и β-КМЦД-обогащённых областей при контакте с анионной поверхностью

липидсодержащей системы. В результате может формироваться зарядовая асимметрия: область липосомы, обращённая к поверхности липидсодержащей системы, может быть обогащена остаточно положительно заряженными кластерами ДОТАП, тогда как β-КМЦД-обогащённые отрицательные домены могут преимущественно располагаться на внешней стороне частицы или в периферической области контакта. Параметры такого эффективного диполя можно оценить через измеренную электрофоретическую подвижность. В приближении Смолуховского [180] ζ-потенциал липосомы, модифицированной β-КМЦД, можно оценить как:

$$\zeta_{\text{β-КМЦД-лип}} = \frac{\mu\eta}{\varepsilon\varepsilon_0} \approx 17 \text{ мВ}, \tag{3.8}$$

где $\eta = 0{,}89$ мПа·с – вязкость воды при 25 °С [181]. ζ-потенциал характеризует потенциал на плоскости скольжения, а не истинный поверхностный потенциал, однако может быть использован для оценки эффективного остаточного заряда липосомы. При $\lambda_Д = 0{,}8$ нм и при оценке радиуса липосомы в сферическом приближении $a \approx 75$ нм эффективный остаточный заряд $Q_{эфф}$ липосомы, модифицированной β-КМЦД, можно оценить как:

$$Q_{эфф} \approx 4\pi\varepsilon\varepsilon_0 a\left(1 + \frac{a}{\lambda_Д}\right)\zeta_{\text{β-КМЦД-лип}} \approx 6{,}6\cdot10^3 e. \tag{3.9}$$

При ориентации липосомы в поле липидсодержащей системы участвует только доля α от общего заряда. Если область контакта рассматривать как малый сферический сегмент высотой $h \approx 1$–2 нм, то $\alpha \approx 0{,}01$. При характерном смещении центра положительного заряда $\Delta x = 5$ нм дипольный момент можно оценить как:

$$p_{лип} \approx \alpha Q_{эфф}\Delta x. \tag{3.10}$$

Энергия ориентации такого диполя в поле анионной поверхности липидсодержащей системы определяется выражением:

$$U_{ориент} = -p_{лип}E_{мем}\cos\theta. \tag{3.11}$$

где $E_{\text{мем}}$ – локальная напряжённость электрического поля липидсодержащей системы в области контакта, θ – угол между дипольным моментом липосомы и направлением поля.

Оценку потенциала анионной поверхности липидсодержащей системы можно проводить в приближении линейной теории Пуассона-Больцмана для плоской заряженной поверхности. В этом приближении потенциал в растворе убывает экспоненциально с расстоянием от поверхности [182,183]:

$$\psi(D) = \psi_{\text{мем}} \exp\left(-\frac{D}{\lambda_{\text{Д}}}\right), \tag{3.12}$$

где $\psi_{\text{мем}}$ – эффективный поверхностный потенциал липидсодержащей системы. Тогда напряжённость электрического поля определяется как модуль градиента потенциала:

$$E_{\text{мем}}(D) = \left|\frac{\mathrm{d}\psi}{\mathrm{d}D}\right| = \frac{|\psi_{\text{мем}}|}{\lambda_{\text{Д}}} \exp\left(-\frac{D}{\lambda_{\text{Д}}}\right). \tag{3.13}$$

Для оценки примем $|\psi_{\text{мем}}|$ = 10–25 мВ [184,185]. При расстояниях D = 2 нм и D = 3 нм получаем $E_{\text{мем}}$(2 нм) ≈ 1,0–2,6 МВ/м, $E_{\text{мем}}$(3 нм) ≈ 0,29–0,73 МВ/м.

При наиболее выгодной ориентации, когда $|\cos\theta| \approx 1$, порядковая оценка энергии составляет:

$$\left|U_{\text{ориент}}\right| \approx 4\text{–}35\ k_{\text{Б}}T. \tag{3.14}$$

Следовательно, даже слабая эффективная поляризация липосомы, модифицированной β-КМЦД, как единого коллоидного объекта может давать энергетический выигрыш, превышающий по порядку энергию тепловых флуктуаций. Эта оценка не доказывает реальное перераспределение доменов, но показывает физическую допустимость предлагаемого механизма.

В рамках предлагаемой модели при приближении к анионной липидсодержащей поверхности липосома с β-КМЦД может принимать ориентацию, при которой остаточно положительно заряженные ДОТАП-обогащённые участки обращены к поверхности, а β-КМЦД-обогащённые полярные области преимущественно располагаются

с внешней по отношению к поверхности стороны липосомы. Такие области могут участвовать в удержании следующей липосомы по механизму, сходному с последовательной чередующейся адсорбцией противоположно заряженных молекул и коллоидных частиц согласно механизму «layer by layer» [186,187]. В результате единичная липосома, модифицированная β-КМЦД, удерживаемая на поверхности липидсодержащей системы, может выступать локальным центром «кооперативного» удержания свободных липосом (рис. 3.12). Дополнительный вклад могут вносить полярные контакты и водородные связи между β-КМЦД-обогащёнными областями, липидами и компонентами гликокаликса.

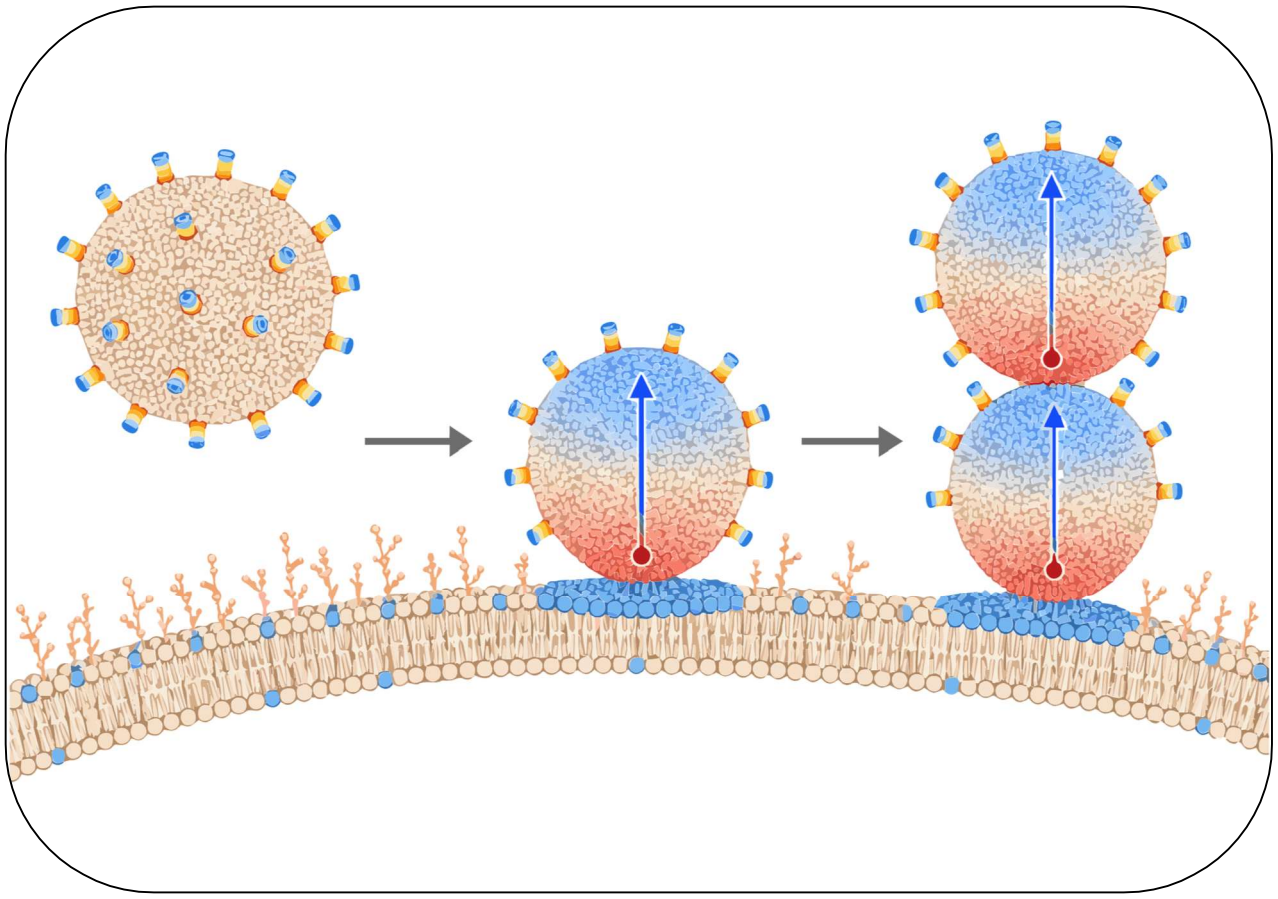


Рисунок 3.12 – Схематическое представление взаимодействия липосомы, модифицированной β-КМЦД, с анионной поверхностью липидсодержащей системы. Слева направо показаны приближение липосомы к липидсодержащей системе, формирование эффективной зарядовой неоднородности при первичном контакте и кооперативное удержание следующей липосомы около уже адсорбированной частицы. Схема иллюстрирует последовательное удержание по механизму, сходному с layer-by-layer, но не классическую сборку плоских чередующихся слоёв. По материалам [А4] с изменениями

Таким образом, модификация поверхности липосомы молекулами β-КМЦД может повысить эффективность взаимодействия коллоида

с липидсодержащими системами, в том числе с клетками, за счёт увеличения эффективной площади контакта, а также «кооперативного связывания» коллоидов, что является примером самоорганизации системы. При этом различия во взаимодействии коллоидов с клетками двух линий могут быть связаны с различиями поверхностных свойств мезенхимальных стволовых клеток и клеток эпителиального рака молочной железы человека. Мембраны раковых клеток могут содержать больше отрицательно заряженных и полярных групп гликокаликса, включая сиаловые кислоты, протеогликаны и гликопротеины, а также у раковых клеток экспрессируется больше различных рецепторов и сайтов связывания метаболитов [188,189]. Данные факторы могут усиливать первичное притяжение остаточно положительно заряженных липосом и одновременно создавать центры для связывания с β-КМЦД-стопками. В результате для линии MDA-MB-231 наблюдается большая абсолютная клеточно-ассоциированная флуоресценция. Совокупность результатов согласуется с предлагаемой моделью «кооперативного» удержания липосом, модифицированных β-КМЦД, у поверхности липидсодержащих систем и делает описанные коллоидные системы перспективными для дальнейшего применения в решении задач биомедицины. Изучение механизмов самоорганизации в системах с β-КМЦД может быть использовано для понимания процессов в живых системах. Результаты, представленные во втором подразделе, позволили выявить особенности взаимодействий исследуемых многокомпонентных биоподобных коллоидных систем с липидсодержащими системами и характерные проявления биофизических механизмов структурной организации исследуемых систем при их взаимодействии с липидсодержащими системами. Показано, что присутствие в многокомпонентной биоподобной коллоидной системе границы раздела фаз также может обеспечивать изменение структурной организации коллоидной системы. При этом нарушение симметрии в системе может приводить к образованию нового уровня структурной организации, проявляющегося в самоорганизации системы. Изменение сформированного коллоидного объекта и создание многокомпонентной системы может привести к проявлению уровня

организации системы, не проявлявшего в однокомпонентных системах. При этом ключевую роль в данных процессах также играют межкомпонентные и межфазные взаимодействия. Выявленные закономерности самоорганизации в многокомпонентных коллоидных системах на основе липосом, модифицированных β-КМЦД, могут быть рассмотрены в контексте общих биофизических механизмов структурной организации в присутствии границы раздела фаз. Сходные принципы, связанные с межмолекулярными взаимодействиями, адсорбцией и пространственной организацией компонентов на поверхности липидсодержащих систем, проявляются при возникновении латеральной гетерогенности мембран тилакоидов [190,191], организации белковых комплексов на клеточных мембранах [192,193] и иных биологических процессах.

Основные результаты изучения взаимодействия липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, с липидсодержащими системами опубликованы автором в соавторстве в работах [А3,А4]. В работах [А3,А4] автор внёс существенный вклад в разработку концепции экспериментов, организацию экспериментальной работы и подготовку исследуемых коллоидных систем. В работе [А3] автором проведены эксперименты с ленгмюровскими липидными монослоями и сформулированы представления о механизме взаимодействия исследуемых коллоидных систем с модельной липидной поверхностью. Автором предложен механизм взаимодействия липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, с рядом липидсодержащих систем.

3.3 Взаимодействие исходно безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ с модельной планарной БЛМ

3.3.1 Прохождение железосодержащих МНЧ через модельную планарную БЛМ и образование комплексов МНЧ и молекул липидов

В рамках диссертационной работы было проведено исследование взаимодействия исходно безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ с модельной планарной БЛМ в водной фазе во внешнем неоднородном стационарном магнитном поле. Были получены новые экспериментальные результаты, указывающие на возможность прохождения исходно безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ во внешнем неоднородном стационарном магнитном поле через модельную планарную БЛМ из азолектина. Для подтверждения прохождения МНЧ через БЛМ в диссертационной работе проводилось исследование адсорбата на ловушке, закреплённой в транс-ячейке кюветы, и анализ жидкостной объемной пробы из транс-ячейки кюветы. Магнитные ловушки исследовались методом ПЭМ и АСМ. Полученные с помощью высокоугловой кольцевой съёмки в тёмном поле ПЭМ-изображения (High-Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy, HAADF), а также полученное методом сканирующей ЭДРС распределение атомов железа (Fe) в адсорбатах на магнитной ловушке представлены на рисунке 3.13.

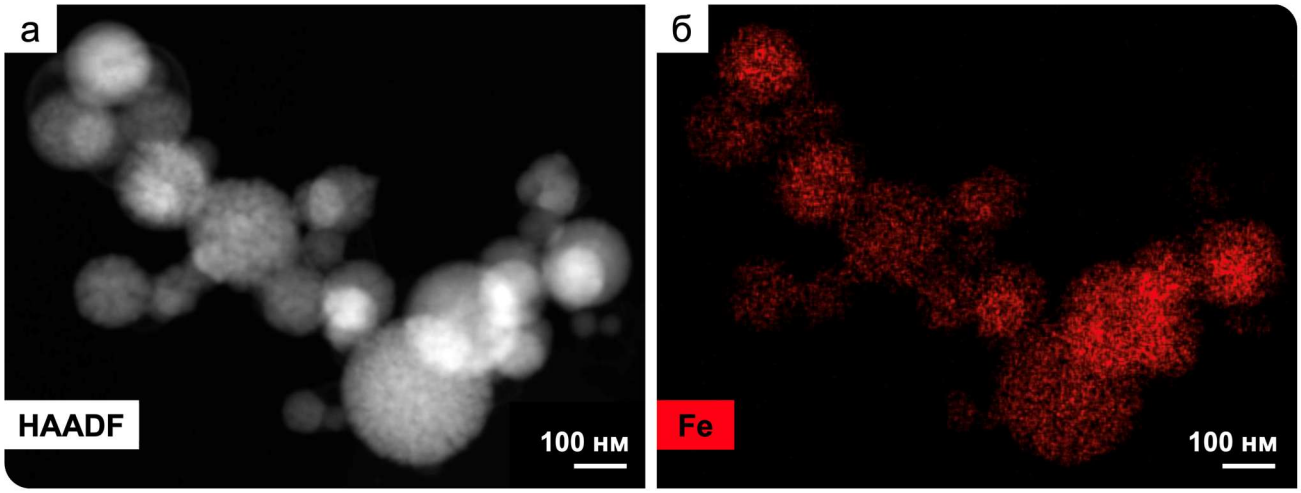


Рисунок 3.13 – Характерные изображения адсорбатов на магнитной ловушке:
а – ПЭМ-изображения в режиме высокоугловой кольцевой съёмки в тёмном поле;
б – распределение атомов железа (Fe) в образцах, полученное методом сканирующей ЭДРС. По материалам [А5] с изменениями

Анализ ПЭМ-изображений выявил образование агрегатов островкового типа. На рисунке 3.13 отчётливо видно составное устройство агрегатов, состоящих из отдельных сферических образований. В образцах адсорбата на магнитной ловушке было установлено присутствие железа (*Fe*), пространственное распределение которого совпадало с расположением обнаруженных агрегатов, что может указывать на присутствие в агрегатах железосодержащих МНЧ. Адсорбаты были дополнительно исследованы в режиме светлого поля методом ПЭМ, при котором контраст изображения определяется степенью рассеяния и поглощения электронного пучка веществом образца (рис. 3.14).

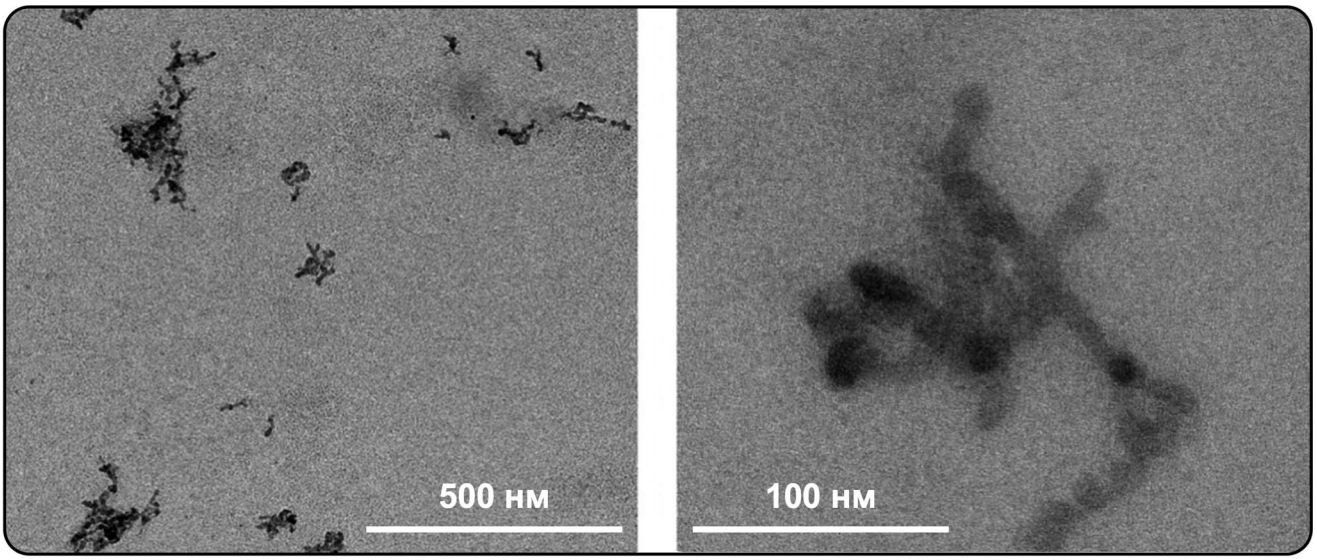


Рисунок 3.14 – Характеризация адсорбатов на магнитной ловушке: а – ПЭМ-изображения агрегатов в режиме светлого поля; б – АСМ-изображения адсорбатов, полученные в полуконтактном режиме; в – АСМ-изображения адсорбатов, полученные в резонансном режиме. По материалам [А5] с изменениями

Из рис. 3.14 видно, что адсорбаты отличаются выраженной структурной неоднородностью – выделяются квази-сферические участки с различной интенсивностью контраста: наиболее тёмные области могут быть отнесены к фрагментам, обогащённым соединениями железа, тогда как менее контрастные зоны предположительно соответствуют органическому веществу липидов [194]. Такое пространственное распределение компонентов может быть вызвано формированием липидсодержащей оболочки вокруг МНЧ или агрегатов МНЧ, образующихся при прохождении МНЧ через планарную БЛМ. Характерный размер агрегатов варьируется от 10 до 300 нм. Таким образом, экспериментальные данные, указывающие на присутствие на магнитных ловушках МНЧ и липидов мембраны позволяют выдвинуть гипотезу о том, что взаимодействие исходно безлигандных катионных железосодержащих МНЧ с планарной БЛМ сопровождается прохождением МНЧ через БЛМ с образованием комплексов МНЧ с липидами мембраны, предположительно коллоидной природы. Важно отметить, что ловушки для исследования образцов методом АСМ и ПЭМ были закреплены на магните для удержания адсорбатов при перемещении, в результате чего структура агрегатов на рисунке 3.13 и рисунке 3.14 может отличаться от их реальной структуры вследствие агрегации в магнитном поле ловушки.

Для визуализации структуры агрегатов МНЧ и липидов из транс-ячейки кюветы с помощью дозатора отбиралась жидкостная проба так, что мембрана оставалась целостной, после чего отобранная проба наносилась на медную сетку с формваровым покрытием и углеродным напылением и исследовалась методом ПЭМ (рис. 3.15а). На ПЭМ-изображениях образца пробы, полученных в режиме тёмного поля, отображены агрегаты сферической формы (рис. 3.15б). Анализ соответствующей карты пространственного распределения элементов в образце позволил установить присутствие МНЧ с липидом в транс-ячейке кюветы, а также предположить, что агрегаты имеют следующую структуру – «ядро» из МНЧ, окружённое липидной мембраной (рис. 3.15в).

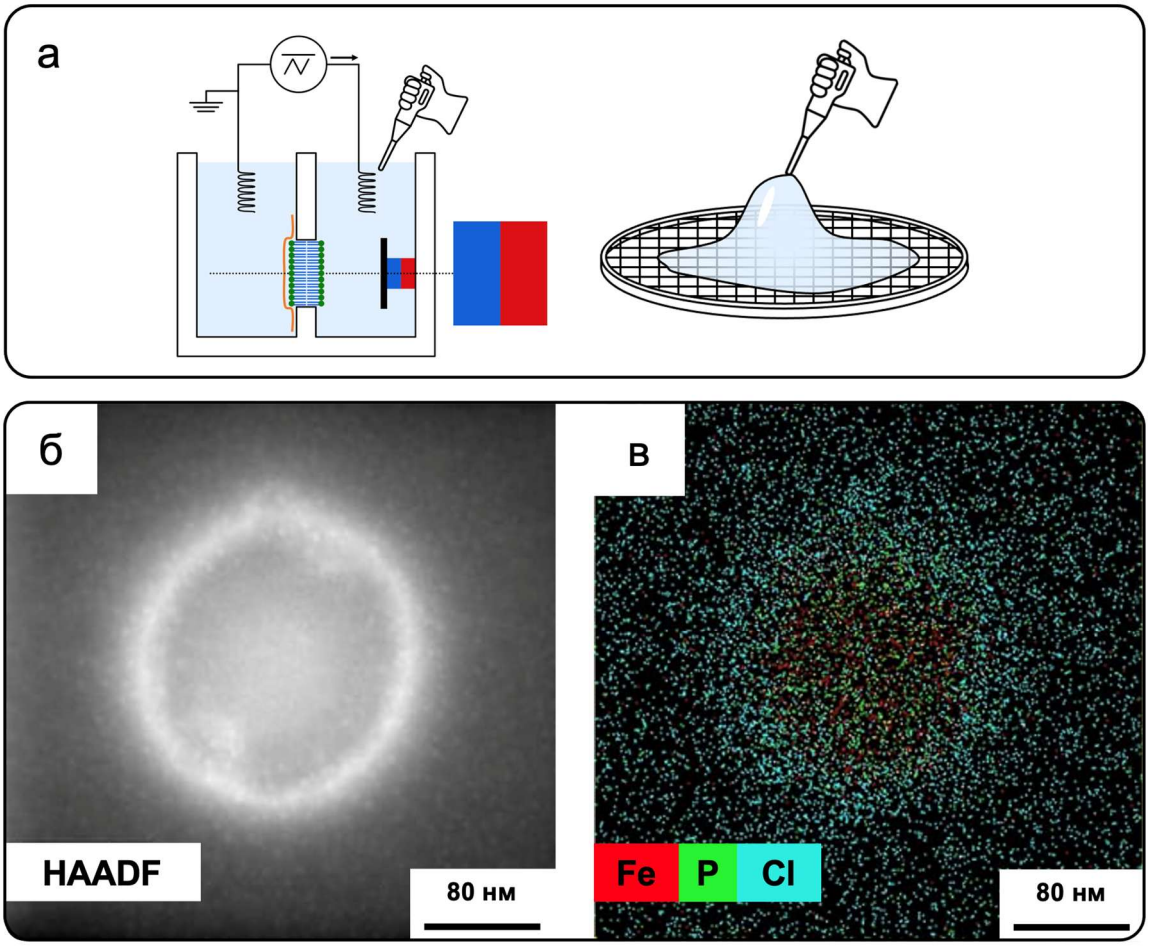


Рисунок 3.15 – Анализ жидкостной пробы из транс-ячейки кюветы: а – схема эксперимента по отбору пробы; б – характерное ПЭМ-изображение образца пробы после высыхания в режиме тёмного поля; в – карта пространственного распределения элементов *Fe*, *P* и *Cl*. По материалам [А6] с изменениями.

Анализ ПЭМ-изображений позволил установить присутствие в транс-ячейке кюветы агрегатов квазисферической формы, размеры которых имеют тот же порядок, что и размеры агрегатов на магнитных ловушках. Так как особенности проведения эксперимента требуют изучения образцов после высыхания, то истинная структура комплексов в объёмной фазе может отличаться от их структуры на изображениях ПЭМ. Из-за особенностей пробоподготовки в образцах также могут присутствовать кристаллы соли, расположение которых коррелирует с расположением элементов хлора *Cl* (рис. 3.15в). Дополнительно жидкостные пробы из транс-ячейки кюветы исследовали методами динамического светорассеяния

и ИК-Фурье спектроскопии; для сопоставления теми же методами исследовали коллоидную суспензию липосом из азолектина. Так, методом динамического светорассеяния был определен гидродинамический радиус агрегатов в жидкостных пробах и липосом из азолектина (рис. 3.16а), а также методом электрофоретического светорассеяния были определены ζ-потенциалы липосом и образцов из транс-ячейки кюветы (рис. 3.16б).

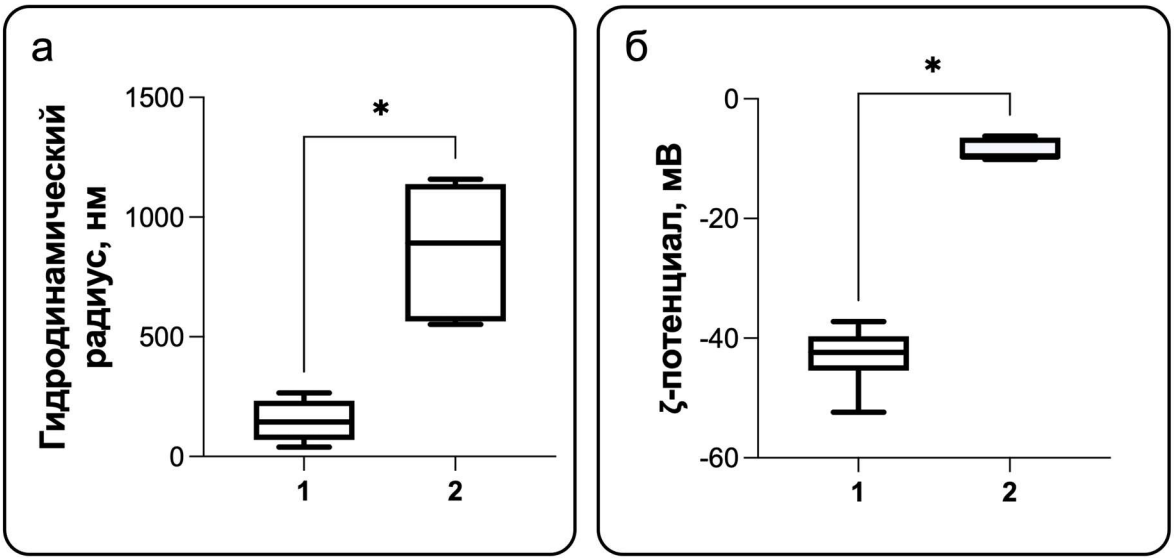


Рисунок 3.16 – Характеристики липосом и агрегатов: а – гидродинамический радиус липосом (1) и агрегатов (2); б – ζ-потенциал липосом (1) и агрегатов (2). Символом * показаны статистически значимые различия согласно критерию Манна–Уитни при p-value < 0,05. По материалам [А6] с изменениями.

Для анализа структуры комплексов, формирующихся при взаимодействии МНЧ с липидной мембраной, применяли метод ИК-Фурье спектроскопии.

На рисунке 3.17 представлены спектр коллоидной суспензии липосом (рис.3.17а) и спектр раствора, отобранного за БЛМ после эксперимента с зарегистрированным прохождением МНЧ (рис.3.17б).

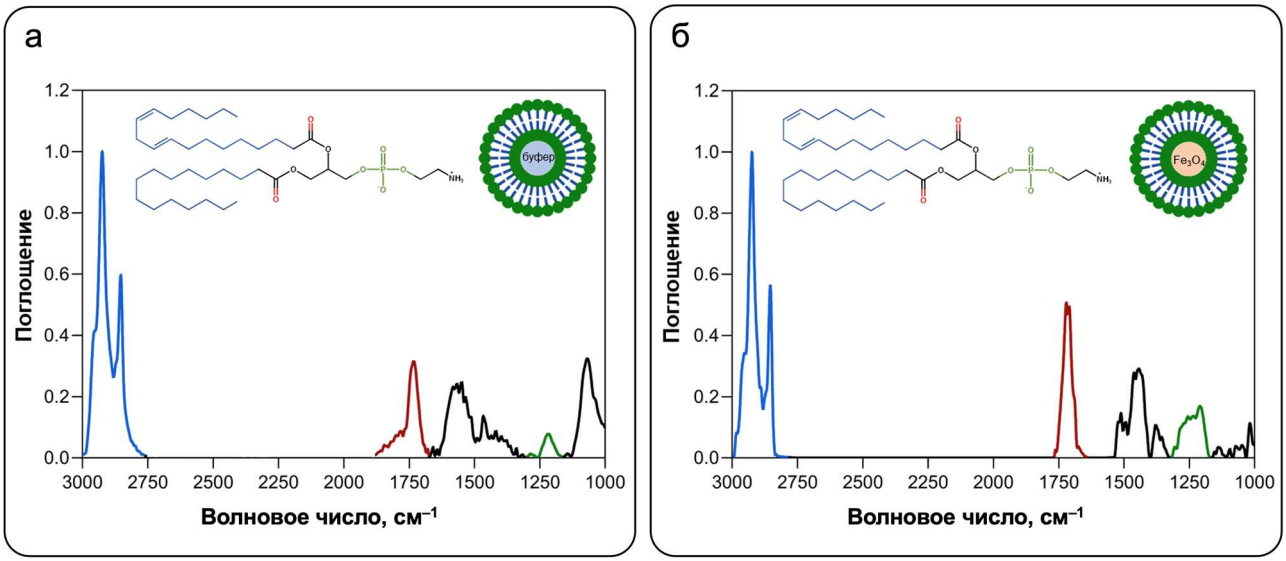


Рисунок 3.17 – ИК-Фурье-спектры: а – липосом из азолектина; б – раствора из транс-ячейки кюветы, отобранного согласно протоколу, описанному в тексте. По материалам [А6] с изменениями

Полосы поглощения на рисунке 3.17 соответствуют функциональным группам липидов мембраны, что независимо указывает на присутствие липидов в агрегатах. Полосы 2924 $см^{-1}$ и 2853 $см^{-1}$ соответствуют асимметричным и симметричным валентным колебаниям метиленовых групп углеводородных цепей и характерны для липидов, находящихся преимущественно в жидкокристаллическом состоянии [195,196]. Полоса в области ~ 1480 $см^{-1}$, обусловленная деформационными колебаниями метиленовых групп, также характерна для жидкокристаллического состояния липидов [197]. На рисунке 3.18 представлены области спектра, соответствующие колебаниям фосфатных (рис. 3.18а) и карбоксильных (рис.3.18б) групп, а также схематическое изображение состояния липидов в азолектиновых липосомах и исследуемом растворе (рис.3.18в).

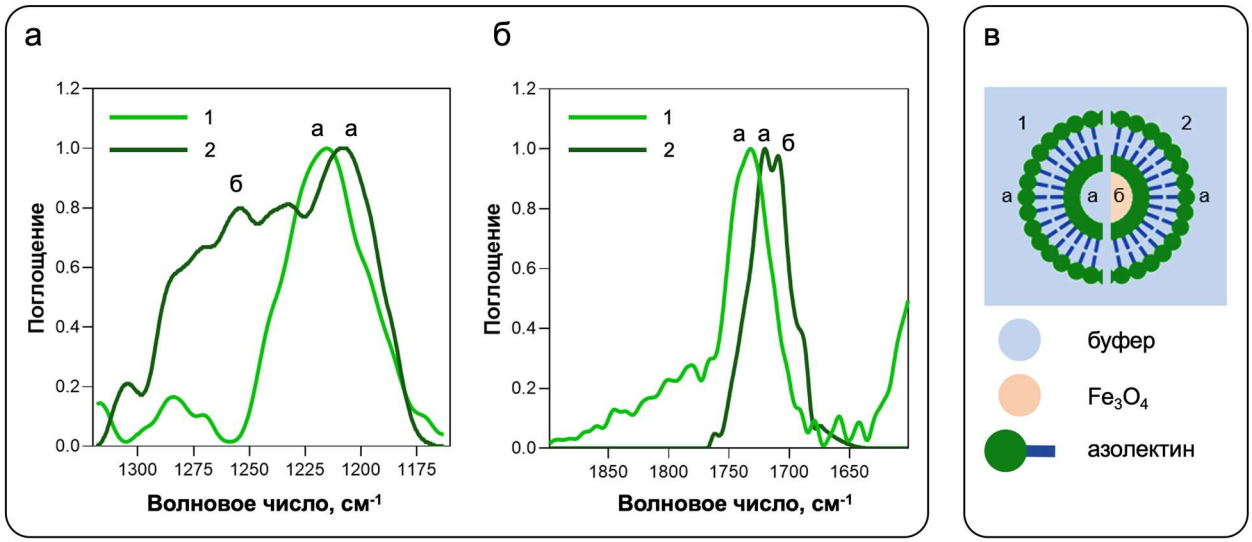


Рисунок 3.18 – ИК-спектры и схема состояния липидов: а – область ИК-спектра, соответствующая колебаниям фосфатных групп PO_2^- азолектиновых липосом (кривая 1) и исследуемого раствора, отобранного за бислойной липидной мембраной (кривая 2); б – область ИК-спектра, соответствующая колебаниям карбоксильных групп COO^- азолектиновых липосом (кривая 1) и исследуемого раствора, отобранного за бислойной липидной мембраной (кривая 2); в – схематическое изображение состояния липидов в азолектиновых липосомах (1) и исследуемом растворе (2). По материалам [А6] с изменениями

В области валентных колебаний фосфатных групп PO_2^- появление высокочастотной компоненты (рис. 3.18а, пик «б», кривая 2) может соответствовать фосфатам внутреннего слоя липидов, дегидратированным в результате связывания с МНЧ, наблюдаемому в системах близкой природы [198]. Низкочастотное смещение основной компоненты (рис. 3.18а, пик «а», кривая 2) может свидетельствовать о большей степени гидратации фосфатных групп липидов комплекса, обращённых к внешней водной фазе, по сравнению с липидами со стороны внутренней поверхности мембраны липосом. В области колебаний карбоксильных групп (рис. 3.18б) наблюдается раздвоение полосы, которое также может соответствовать различной степени гидратации липидов, обращённых в водную фазу, и липидов, связанных с МНЧ. Расщепление полос колебаний фосфатных и карбоксильных групп согласуется с моделью липидного бислоя, обёртывающего МНЧ: липиды внутреннего слоя контактируют с неорганической поверхностью посредством карбонильных и фосфатных групп и характеризуются пониженной гидратацией, тогда как липиды внешнего слоя обращены в водную фазу и находятся в более гидратированном состоянии

[198,199]. Для неионизированной карбоксильной группы характерны полосы в интервале 2500–2800 $см^{-1}$, связанные с валентными колебаниями *OH*-групп, включённых в структуры карбоновых кислот, и интенсивная полоса валентных колебаний связи *C=O* вблизи 1700 $см^{-1}$. Такой характер спектральных изменений может свидетельствовать об изменении структуры липидного слоя в результате связывания карбоксильных групп липидов с поверхностью МНЧ [196]. Возможность локальной перестройки фосфолипидного бислоя при взаимодействии с заряжённой МНЧ показана в работе [95]. В той же работе описано, как взаимодействие липидов с катионным коллоидом может приводить к уменьшению угла ориентации полярной головы и плотности упаковки липидов.

Полученные экспериментальные данные позволяют предположить, что при взаимодействии МНЧ с внутренней поверхностью бислоя липиды внешнего слоя мембраны становятся более доступными для молекул воды, что может сопровождаться увеличением степени их гидратации и смещением пика колебаний фосфатных и карбоксильных групп. Так, сравнение ИК-спектров липосом и пробы из транс-ячейки свидетельствует о наличии липидов в исследуемом образце, что ранее было также показано методами ПЭМ и АСМ и позволяет предположить формирование упорядоченной липидной оболочки бислойного типа на поверхности МНЧ. О возможности взаимодействия МНЧ с липидами мембраны свидетельствует и сдвиг изотермы сжатия монослоя азолектина (рис. 3.19а) и изменение модуля сжатия монослоя $C_s^{-1} = -A(\frac{d\pi}{dA})$ (рис. 3.19б) при включении в состав буферной среды МНЧ.

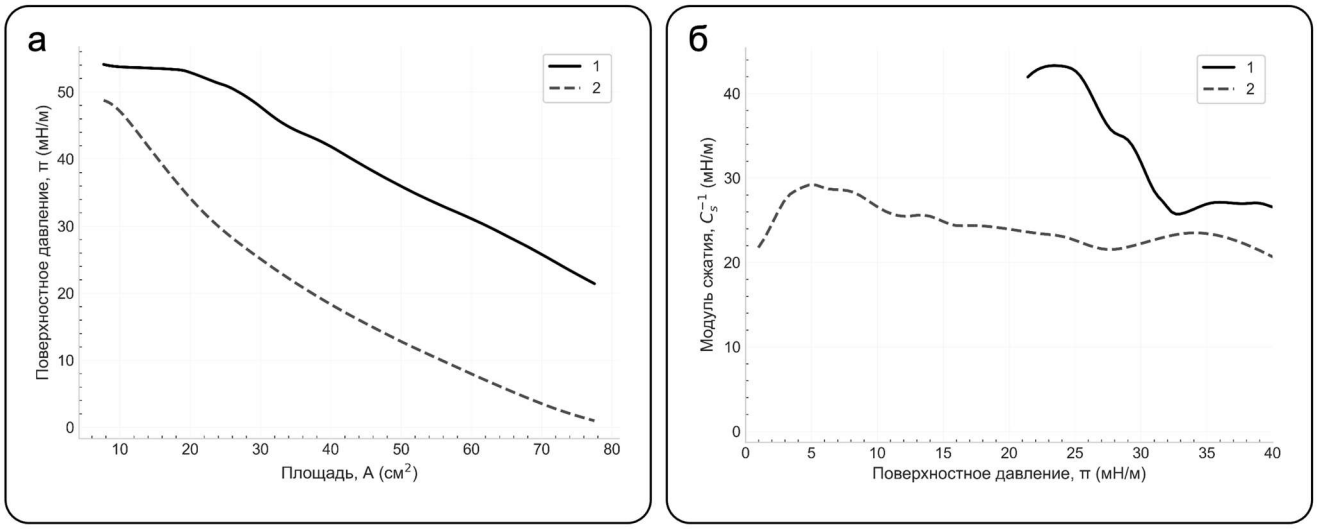


Рисунок 3.19 – Характеристики монослоя азолектина на водной субфазе: а – изотермы сжатия монослоя при добавлении МНЧ в субфазу (кривая 1) и без МНЧ (кривая 2); б – модуль сжатия монослоя при добавлении МНЧ в субфазу (кривая 1) и без МНЧ (кривая 2). По материалам [А6] с изменениями

Для изучения характера взаимодействия МНЧ с монослоем азолектина методом Ленгмюра-Шеффера был осуществлён перенос липидного монослоя с поверхностным адсорбатом МНЧ на поверхность подложки из слюды, закреплённой на постоянный неодимовый магнит, зависимость магнитной индукции (мТл) и градиента индукции (мТл/мм), взятого со знаком минус, от расстояния от поверхности магнита которого соответствуют использованному в опытах с планарной БЛМ. Поверхность подложки была исследована методом АСМ в полуконтактном режиме. На рисунке 3.20 представлены схема экспериментальной установки (рис.3.20а) и топографические АСМ-изображения поверхностных адсорбатов на подложке из слюды (рис.3.20б).

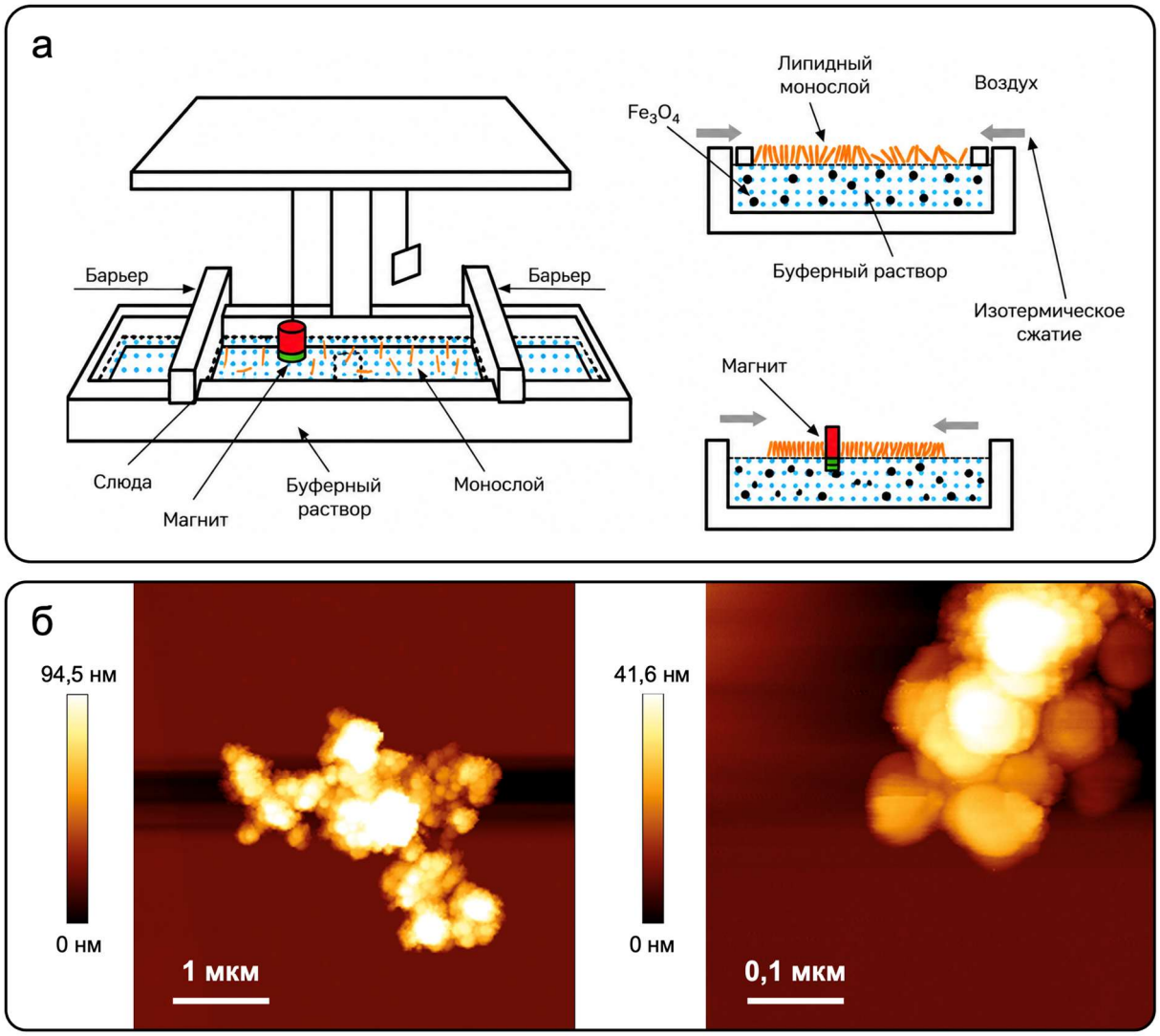


Рисунок 3.20 – Исследование взаимодействия МНЧ с ленгмюровским монослоем азолектина: а – схема эксперимента; б – топографические АСМ-изображения поверхностных адсорбатов на подложке из слюды. По материалам [А6] с изменениями

Анализ АСМ-изображений позволяет предположить формирование сложноорганизованных структур липидов и МНЧ, состоящих из отдельных агрегатов размером в десятки нанометров, которые могут формироваться при взаимодействии МНЧ с поверхностью липидсодержащей системы. Структура агрегатов схожа со структурой адсорбатов, установленной в экспериментах по изучению взаимодействия МНЧ с модельной планарной БЛМ, что указывает на предложенный механизм прохождения МНЧ через БЛМ с образованием комплексов МНЧ и липидов мембраны.

3.3.2 Биофизические механизмы взаимодействия и прохождения исходно безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ через модельную планарную БЛМ

В диссертационной работе были рассмотрены биофизические механизмы взаимодействия и прохождения МНЧ через модельную планарную БЛМ. Наличие поверхностного заряда делает локализацию МНЧ в гидрофобной области мембраны энергетически невыгодной. Причём изменение энергии сольватации МНЧ пропорционально квадрату заряда коллоида $\Delta G_{\text{Born}}(kT) \approx 5Z^2 kT$, что значительно снижает вероятность локализации агрегатов МНЧ внутри гидрофобной области мембраны. Правило Борна [103,200] позволяет сопоставить электростатические энергии МНЧ в мембране и в экранирующем водном растворе:

$$G_{\text{м}} = \frac{Q_{\text{м}}^{\ 2}}{8\pi\varepsilon_0\varepsilon_{\text{м}}a},\ G_{\text{в}} = \frac{Q_{\text{в}}^{\ 2}}{8\pi\varepsilon_0\varepsilon_{\text{в}}a(1+\kappa a)}. \tag{3.15}$$

Из равенства энергий следует соотношение зарядов частицы в мембране $Q_{\text{м}}$ и в водной фазе $Q_{\text{в}}$ при $\kappa^{-1} \approx 3$ нм:

$$Q_{\text{м}} = Q_{\text{в}}\left[\frac{\varepsilon_{\text{м}}}{\varepsilon_{\text{в}}(1+\kappa a)}\right]^{1/2} \approx 0{,}14Q_{\text{в}}. \tag{3.16}$$

Таким образом, для локализации МНЧ внутри гидрофобной области мембраны необходимо существенно уменьшить эффективный заряд МНЧ. Уменьшение заряда частицы может быть обусловлено образованием комплексов МНЧ с липидами мембраны. Во внутримембранной области могут находиться отдельные комплексы МНЧ-липид с эффективным зарядом Q_{A}, которые после выхода из мембраны могут объединяться в агрегаты. Число n МНЧ в агрегатах может быть определено из условия сопоставимости энергии сольватации комплексов из n МНЧ-липид с зарядом $Q_{\text{м}}$ и радиусом a, расположенных во внутримембранном пространстве и энергии сольватации агрегатов МНЧ с зарядом Q_{A} и радиусом R_{A} в водном растворе:

$$n\frac{Q_{\text{м}}^2}{8\pi\varepsilon_0\varepsilon_{\text{м}}a} = \frac{Q_{\text{A}}^2}{8\pi\varepsilon_0\varepsilon_{\text{в}}R_{\text{A}}(1+\kappa R_{\text{A}})}. \tag{3.17}$$

Для оценки характерного размера агрегата при допущении о сохранении суммарного эффективного заряда при объединении комплексов $Q_A = nQ_м$, а также в приближении квазисферической формы агрегата $R_A = an^{1/3}$:

$$n^{1/3} = \frac{\varepsilon_в \kappa a + \sqrt{(\varepsilon_в \kappa a)^2 + 4\varepsilon_м \varepsilon_в}}{2\varepsilon_м}. \quad (3.18)$$

Диаметр агрегата определяется как:

$$D_A = 2R_A = 2an^{1/3}. \quad (3.19)$$

При параметрах системы $\varepsilon_в = 80$ и $\varepsilon_м = 2{,}7$, а также с учётом экспериментального разброса диаметра исходных МНЧ, характерный диаметр агрегатов можно оценить как:

$$D_A \approx 20\text{–}100 \text{ нм}. \quad (3.20)$$

Полученный диапазон согласуется по порядку величины с характерными размерами квазисферических комплексов МНЧ-липид, наблюдаемыми в экспериментах. Приведённая оценка определяет характерный размер агрегатов в рамках принятых приближений. При этом анализ результатов исследования адсорбата разнообразными независимыми физико-химическими методами демонстрирует присутствие как железосодержащей фазы, так и органической липидной фазы. Более того, полученные данные указывают на формирование агрегатов МНЧ, окруженных липидной оболочкой, и позволяют сделать предположение о формировании бислойных липидных оболочек. Полученные экспериментальные данные указывают на возможный механизм прохождения МНЧ через планарную БЛМ путём «оборачивания» липидной оболочкой – механизм, сходный с процессом эндоцитоза в клетках [104]. Для обоснования предложенных механизмов прохождения МНЧ через БЛМ и для подтверждения адекватности полученных экспериментальных данных выполнены предварительные оценки изменений энергий в процессах взаимодействий в системе «МНЧ – планарная БЛМ» (см. ПРИЛОЖЕНИЕ В). Существование оптимума свободной энергии в системе МНЧ - планарная БЛМ для определённых значений радиусов коллоидов согласуется с размерами обнаруженных в транс-

ячейке агрегатов размером в десятки нанометров и может указывать на прохождение через мембрану агрегатов МНЧ. В ПРИЛОЖЕНИИ Г приведены оценки состояния МНЧ в экспериментах по изучению взаимодействия МНЧ с модельной планарной БЛМ, позволяющие предположить возможность прохождения через планарную БЛМ агрегатов МНЧ, представляющих собой звенья цепочечных структур, которые могут формировать МНЧ в цис-ячейке кюветы.

Отметим, что вклад магнитного поля B в перенос МНЧ с магнитным моментом m через планарную БЛМ можно оценить как:

$$W_{\text{маг}} = -m\Delta B < 1\ k_{\text{Б}}T. \qquad (3.21)$$

Это подчёркивает, что ключевая роль магнитного поля в системе состоит в локализации МНЧ и их агрегатов у поверхности БЛМ.

Полученные результаты подчёркивают способность системы к самоорганизации, в результате которой прохождение МНЧ через мембрану определяется параметрами самой системы. Обнаруженный эффект прохождения исходно безлигандных катионных коллоидных железосодержащих МНЧ через модельную планарную БЛМ даёт представление о физико-химических механизмах проникновения МНЧ через липидные мембраны и может быть характерен и для других биологических и искусственных коллоидных объектов, что является важным для понимания биофизических механизмов процессов трансмембранного переноса в природе. Результаты, представленные в третьем подразделе, позволили выявить особенности взаимодействий и характерные проявления биофизических механизмов формирования и структурной организации биоподобных коллоидных систем при взаимодействии с липидсодержащими системами. Показано, что взаимодействие коллоидной системы не только с поверхностью липидсодержащей системы, но и с её компонентами, может привести к формированию новой системы. При этом механизмы образования комплексов липидов и МНЧ при взаимодействии МНЧ с планарной БЛМ, в первую очередь межкомпонентные и межфазные взаимодействия, могут быть полезны для

объяснения процессов трансцитоза и объяснения поведения вирусов и наночастиц в живых системах.

Основные результаты исследования взаимодействия МНЧ с планарной БЛМ опубликованы автором в соавторстве в работах [А5,А6]. В работах [А5,А6] автором синтезированы и охарактеризованы железосодержащие МНЧ; автор внёс существенный вклад в планирование, подготовку и проведение экспериментов с планарной БЛМ, анализ результатов и формирование представлений о механизме переноса МНЧ через мембрану. В работе [А6] автором выполнены измерения гидродинамических размеров и электрокинетических характеристик коллоидных систем, проведены эксперименты с ленгмюровскими монослоями. Кроме того, автор внёс существенный вклад в проведение исследований методами АСМ, ПЭМ и ИК-Фурье спектроскопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены биоподобные коллоидные системы на основе липидов, линейных и циклических заряженных макромолекул и железосодержащих МНЧ, в том числе полимерные комплексы на основе ПАК с молекулярными массами 2100 Да, 8000 Да и 15000 Да и биогенного полиамина спермина.

2. Установлено, что полимерные коллоидные комплексы на основе ПАК с молекулярными массами 2100 Да, 8000 Да и 15000 Да и биогенного полиамина спермина имеют характерные гидродинамические диаметры 50–300 нм, величина которых зависит от молекулярной массы ПАК и отношения числа мономерных звеньев полимера к числу молекул спермина. Методом УФ-спектрофотометрии были получены данные, указывающие на возможность включения молекул противоопухолевого препарата доксорубицина в состав полимерных комплексов. Методом ЭПР были получены данные, указывающие на формирование железосодержащих МНЧ в составе полимерных комплексов.

3. Установлено, что молекулы β-КМЦД могут взаимодействовать с ленгмюровскими монослоями из смеси электронейтрального и катионного липидов с образованием надмолекулярных структур высотой ~2 нм по данным АСМ. Предложен механизм взаимодействия липосом из смеси электронейтрального и катионного липидов, модифицированных β-КМЦД, с рядом липидсодержащих систем.

4. Показано, что исходно безлигандные катионные коллоидные железосодержащие МНЧ во внешнем неоднородном стационарном магнитном поле могут проходить через модельную планарную БЛМ из азолектина. В процессе взаимодействия МНЧ с планарной БЛМ и их прохождения через неё могут образовываться комплексы МНЧ с молекулами липидов с характерным размером 10–300 нм по данным ПЭМ.

В диссертационной работе на примере биоподобных коллоидных систем различного состава выявлены особенности взаимодействий и характерные проявления биофизических механизмов в процессах формирования и структурной

организации в объёмной водной фазе и на границах раздела фаз, а также при взаимодействии с липидсодержащими системами. Результаты работы расширяют представление о роли межкомпонентных и межфазных взаимодействий, в том числе электростатических, в структурной организации биоподобных коллоидных систем и могут быть использованы для дальнейшего исследования процессов структурной организации коллоидных систем и их взаимодействий с липидсодержащими системами, для понимания механизмов ряда процессов в биологических системах, а также при разработке новых функциональных коллоидных систем для потенциальных биомедицинских применений, в том числе для управляемой доставки биологически активных и лекарственных соединений. В частности, выявленные зависимости размеров полимерных комплексов ПАК и спермина от состава компонентов могут быть использованы при выборе оптимальных условий их формирования. При исследовании связывания липосом, модифицированных β-КМЦД, с липидсодержащими системами целесообразно учитывать особенности структурной организации их поверхности. Результаты исследования взаимодействия МНЧ с планарной БЛМ следует учитывать при изучении процессов переноса МНЧ через липидные мембраны.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.011.9 по специальности 1.5.2. Биофизика по физико-математическим наукам:

А1. **Григорян И.В.**, Спиридонов В.В., Адельянов А.М., Кокшаров Ю.А., Потапенков К.В., Таранов И.В., Хомутов Г.Б., Ярославов А.А. Новые магнитные коллоидные системы на основе биомиметических поликомплексов // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2024. – Т. 65, № 3. – С. 202–208. EDN: JGPPPO. Импакт-фактор 0,635 (РИНЦ). Объем: 0,45 п.л. / Вклад соискателя 0,07 п.л.

Переводная версия статьи:

Grigoryan I.V., Spiridonov V.V., Adelyanov A.M., Koksharov Yu.A., Potapenkov K.V., Taranov I.V., Khomutov G.B., Yaroslavov A.A. New magnetic colloidal systems based on biomimetic polycomplexes // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2024. – vol. 79, № 3. – pp. 170–174. EDN: JGPPPO.

А2. **Григорян И.В.**, Адельянов А.М., Пархаева А.П., Хомутов Г.Б., Симоненко Е.Ю., Миронова А.Г., Пигарева В.А., Сыбачин А.В. Особенности формирования комплексов β-карбоксиметил циклодекстринов на поверхности липидных монослоёв // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. – 2024. – Т. 79, № 5. – С. 2450701. EDN: ELRHSF. Импакт-фактор 0,516 (РИНЦ). Объем: 0,55 п.л. / Вклад соискателя 0,18 п.л.

Переводная версия статьи:

Grigoryan I.V., Adelyanov A.M., Parkhaeva A.P., Khomutov G.B., Simonenko E.Yu., Mironova A.G., Pigareva V.A., Sybachin A.V. Features of the formation of complexes of β-carboxymethyl cyclodextrins on the surface of lipid monolayers // Moscow University Physics Bulletin. – 2024. – vol. 79, № 5. – pp. 621–626. EDN: ELRHSF.

А3. **Grigoryan I.V.**, Khomutov G.B., Velikanov A.N., Grigorian A.P., Yakovenko L.V., Huang X., Sybachin A.V. Peculiarities of adsorption of nanocarriers on planar lipid

surfaces // Mendeleev Communications. – 2026. – vol. 36, № 3. – pp. 305–307. EDN: JEVNXI. Импакт-фактор 0,24 (JCI). Объем: 0,33 п.л. / Вклад соискателя 0,13 п.л.

A4. **Grigoryan I.V.**, Tyurin-Kuzmin P.A., Velikanov A.N., Bleskin D.A., Grigorian A.P., Mamin I.M., Khomutov G.B., Sybachin A.V. Cooperative membrane retention: How does β-CMCD coating enhance cationic liposome association with cells? // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2026. – vol. 830. – P. 154298. EDN: SYMAHW. Импакт-фактор 0,59 (JCI). Объем: 0,83 п.л. / Вклад соискателя 0,25 п.л.

A5. Anosov A.A., Borisova E.D., Smirnova E.Yu., Cheburenkova A.S., Cherepenin V.A., Taranov I.V., **Grigoryan I.V.**, Yaroslavov A.A., Spiridonov V.V., Khomutov G.B. Penetration of hydrophilic colloidal magnetite nanoparticles through a lipid membrane in an inhomogeneous magnetic field // Physics of Fluids. – 2024. – vol. 36, № 11. – P. 112035. EDN: ZWAKPW. Импакт-фактор 1,09 (JCI). Объем: 1,57 п.л. / Вклад соискателя 0,3 п.л.

A6. **Григорян И.В.**, Таранов И.В., Ле-Дейген И.М., Борисова Е.Д., Аносов А.А., Колмогоров И.М., Кравцов И.Д., Адельянов А.М., Ярославов А.А., Спиридонов В.В., Хомутов Г.Б., Черепенин В.А. Взаимодействие наночастиц магнетита с бислойной липидной мембраной // Журнал радиоэлектроники. – 2025. – № 11. EDN: CFTZQX. Импакт-фактор 0,275 (РИНЦ). Объем: 0,97 п.л. / Вклад соискателя 0,38 п.л.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубочайшую признательность научному руководителю Геннадию Борисовичу Хомутову за наставничество и неоценимый вклад в становление; Андрею Владимировичу Сыбачину за профессионализм и открытость; Василию Владимировичу Спиридонову за руководство первой научной работой; Игорю Владимировичу Таранову за вовлечённость; Леониду Владимировичу Яковенко за возможность учиться; Артёму Маратовичу Адельянову, Евгению Александровичу Генералову, Екатерине Юрьевне Симоненко, Дмитрию Юрьевичу Нечипуренко, Александру Николаевичу Тихонову, Ларисе Леонидовне Меньшениной и всему коллективу кафедры биофизики во главе с Всеволодом Александровичем Твердисловым за оказанное доверие; Андрею Анатольевичу Аносову, Александру Анатольевичу Ярославову, Елизавете Дмитриевне Борисовой, Александру Николаевичу Великанову, Петру Алексеевичу Тюрину-Кузьмину, Дмитрию Алексеевичу Блескину, Ирине Михайловне Ле-Дейген за совместную работу; кафедре ВМС Химического факультета МГУ, ИРЭ РАН, Физическому факультету и Московскому Университету.

Автор выражает личную благодарность любимой Маме, дорогой Алине, Антону, сёстрам и братьям, дядям и тётям, Анатолию Алексеевичу, Ирине Анатольевне, Павлу Юрьевичу, дяде Серёже, тёте Лене, дедушке, дорогим родственникам, друзьям, всем неравнодушным.

Автор выражает признательность председателю диссертационного совета Владиславу Яковлевичу Панченко, заместителю председателя диссертационного совета Александру Павловичу Шкуринову и, в особенности, учёному секретарю диссертационного совета Любови Андреевне Осминкиной.

Особая благодарность моей жене - Анечке.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

БЛМ – бислойная липидная мембрана

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДЛВО – Дерягин-Ландау-Вервей-Овербек

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДОТАП – 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропанхлорид

ДОФХ – 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин

ИК – инфракрасный

МНЧ – магнитная наночастица

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПАК – натриевая соль полиакриловой кислоты

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

РНК – рибонуклеиновая кислота

УФ – ультрафиолет

ЦД – циклодекстрин

ЭДРС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЭФП - электрофоретическая подвижность

β-КМЦД – β-карбоксиметилциклодекстрин

азолектин: природная смесь фосфолипидов

монослой – мономолекулярный слой

поликомплекс: полимерный комплекс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gerth M., Voets I. K. Molecular control over colloidal assembly // Chemical Communications. Royal Society of Chemistry, 2017. Т. 53, № 32. С. 4414–4428.
2. Heo J. и др. Colloidal phenomena reflect the interplay between interfacial solution structure, interparticle forces, and dynamical response // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2025. Т. 75. С. 101887.
3. Henglein A. Electronics of Colloidal Nanometer Particles // Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie. 1995. Т. 99, № 7. С. 903–913.
4. Kovalchuk N. M. и др. Interactions between nanoparticles in nanosuspension // Adv. Colloid Interface Sci. 2019. Т. 272. С. 102020.
5. Qiao Z., Feng H., Zhou J. Molecular dynamics simulations on the melting of gold nanoparticles // Phase Transitions. 2014. Т. 87, № 1. С. 59–70.
6. Deryagin B. V. The Stability of Colloid Systems (Theoretical Aspects) // Russian Chemical Reviews. 1979. Т. 48, № 4. С. 363–388.
7. Frumkin A. Part II.—(A) Electrokinetic equations. The study of the double layer at the metal-solution interface by electrokinetic and electrochemical methods // Trans. Faraday Soc. 1940. Т. 35. С. 117–127.
8. Ребиндер П. А. Избранные труды. Поверхностные явления в дисперсных системах. Т. 1. Коллоидная химия. Москва: Наука, 1978. 368 с.
9. Вернадский В. И. Биосфера. Ленинград: Научно-химико-техническое издательство, 1926. 147 с.
10. Опарин А. И. Жизнь, её природа, происхождение и развитие. 2-е доп. изд. Москва: Наука, 1968. 173 с.
11. Yang M., Kotov N. A. Quantitative biomimetics of high-performance materials // Nat. Rev. Mater. Nature Research, 2025. Т. 10, № 5. С. 382–395.
12. Rideau E. и др. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking // Chem. Soc. Rev. 2018. Т. 47, № 23. С. 8572–8610.

13. Peigneux A. и др. Learning from magnetotactic bacteria: A review on the synthesis of biomimetic nanoparticles mediated by magnetosome-associated proteins // J. Struct. Biol. 2016. Т. 196, № 2. С. 75–84.
14. Vincent J. F. V. и др. Biomimetics: Its practice and theory // Journal of the Royal Society Interface. Royal Society, 2006. Т. 3, № 9. С. 471–482.
15. Joyce P. и др. A translational framework to DELIVER nanomedicines to the clinic // Nat. Nanotechnol. 2024. Т. 19, № 11. С. 1597–1611.
16. Osminkina L. A., Timoshenko V. Yu. Porous Silicon as a Sensitizer for Biomedical Applications // Open Material Sciences. 2016. Т. 3, № 1.
17. Koksharov Yu. A. и др. Magnetic Nanoparticles in Medicine: Progress, Problems, and Advances // Journal of Communications Technology and Electronics. Pleiades journals, 2022. Т. 67, № 2. С. 101–116.
18. Khomutov G. B., Koksharov Y. A. Organized Ensembles of Magnetic Nanoparticles: Preparation, Structure, and Properties // Magnetic Nanoparticles. Wiley, 2009. С. 117–195.
19. Teixeira M. C., Carbone C., Souto E. B. Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery // Prog. Lipid Res. 2017. Т. 68. С. 1–11.
20. Abasian P. и др. Polymeric nanocarriers in targeted drug delivery systems: A review // Polym. Adv. Technol. 2020. Т. 31, № 12. С. 2939–2954.
21. Dehchani A. J., Jafari A., Shahi F. Nanogels in Biomedical Engineering: Revolutionizing Drug Delivery, Tissue Engineering, and Bioimaging // Polym. Adv. Technol. 2024. Т. 35, № 10.
22. Maximchik P. V. и др. Biodegradable Porous Silicon Nanocontainers as an Effective Drug Carrier for Regulation of the Tumor Cell Death Pathways // ACS Biomater. Sci. Eng. 2019. Т. 5, № 11. С. 6063–6071.
23. Kalepu S., Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects // Acta Pharm. Sin. B. 2015. Т. 5, № 5. С. 442–453.

24. Poulson B. G. и др. Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications // Polysaccharides. 2022. Т. 3, № 1. С. 1–31.
25. Esteso M. A., Romero C. M. Cyclodextrins: Properties and Applications // Int. J. Mol. Sci. 2024. Т. 25, № 8. С. 4547.
26. Skuredina A. A., Kudryashova E. V. Cyclodextrin increases the effectiveness of albumin’s interaction with antibacterial drugs and their combinations // Mendeleev Communications. 2025. Т. 35, № 1. С. 76–78.
27. Brewster M. E., Loftsson T. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2010. Т. 62, № 11. С. 1607–1621.
28. Hadadian M. и др. Comparative study of β-cyclodextrin and carboxymethyl-β-cyclodextrin as effective drug delivery systems for oxymetholone: Design, preparation, characterization, phase solubility and in vitro drug release studies // Journal of Science: Advanced Materials and Devices. 2024. Т. 9, № 3. С. 100751.
29. Allahyari R. и др. Unlocking finasteride’s potential via carboxymethyl-β-cyclodextrin inclusion complex for androgenic alopecia // Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. 2025. Т. 10. С. 100767.
30. Saokham P. и др. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes // Molecules. 2018. Т. 23, № 5. С. 1161.
31. Кулакова И. И. и др. Направленный транспорт лекарственных средств: от идеи до внедрения. Рязань: ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, 2018. 104 с.
32. Mu W. и др. A Review on Nano-Based Drug Delivery System for Cancer Chemoimmunotherapy // Nanomicro Lett. 2020. Т. 12, № 1. С. 142.
33. Maeda H., Seymour L. W., Miyamoto Y. Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in vivo // Bioconjug. Chem. 1992. Т. 3, № 5. С. 351–362.
34. Kumar Khanna V. Targeted Delivery of Nanomedicines // ISRN Pharmacol. 2012. Т. 2012. С. 1–9.

35. Owen J., Pankhurst Q., Stride E. Magnetic targeting and ultrasound mediated drug delivery: Benefits, limitations and combination // International Journal of Hyperthermia. 2012. Т. 28, № 4. С. 362–373.
36. Klostergaard J., Seeney C. E. Magnetic nanovectors for drug delivery // Nanomedicine. 2012. Т. 8. С. S37–S50.
37. Ruuge E. K., Rusetski A. N. Magnetic fluids as drug carriers: Targeted transport of drugs by a magnetic field // J. Magn. Magn. Mater. 1993. Т. 122, № 1–3. С. 335–339.
38. Liong M. и др. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery // ACS Nano. 2008. Т. 2, № 5. С. 889–896.
39. Wei J. и др. Magnetite Nanoparticle Assemblies and Their Biological Applications: A Review // Molecules. 2024. Т. 29, № 17. С. 4160.
40. Nowak-Jary J., Machnicka B. Comprehensive Analysis of the Potential Toxicity of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications: Cellular Mechanisms and Systemic Effects // Int. J. Mol. Sci. 2024. Т. 25, № 22. С. 12013.
41. Gandarias L., Kimber R. L., Ona-Nguema G. Environmental, Biomedical, and Industrial Applications of Biogenic Magnetite Nanoparticles // Elements. 2023. Т. 19, № 4. С. 228–233.
42. Блюменфельд Л. А., Бендерский В. А., Калмансон А. Э. О возможности различных объяснений аномальных магнитных свойств макромолекулярных соединений // Биофизика. 1961. Т. 6, № 6. С. 631–637.
43. Spiridonov V. V. и др. Method for synthesizing iron(iii) oxide and oxohydroxide nanoparticles in alginate—polyvinyl alcohol and alginate—polystyrene sulfonate polymer blends // Russian Chemical Bulletin. 2025. Т. 74, № 3. С. 747–754.
44. Liao J., Huang H. Review on Magnetic Natural Polymer Constructed Hydrogels as Vehicles for Drug Delivery // Biomacromolecules. 2020. Т. 21, № 7. С. 2574–2594.
45. Cao H. и др. Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity // Signal Transduct. Target. Ther. 2021. Т. 6, № 1. С. 426.

46. Mironova A. G. и др. The Use of Cholesterol/Randomly Methylated β-Cyclodextrin (RAMEB) Inclusion Complexes to Improve Human Spermatozoa Cryosurvival // Biofizika. 2024. Т. 69, № 6. С. 1390–1401.
47. Cengiz B. и др. Self-Assembly of Cyclodextrin-Coated Nanoparticles:Fabrication of Functional Nanostructures for Sensing and Delivery // Molecules. 2023. Т. 28, № 3. С. 1076.
48. Elsana H. и др. Evaluation of novel cationic gene based liposomes with cyclodextrin prepared by thin film hydration and microfluidic systems // Sci. Rep. 2019. Т. 9, № 1. С. 15120.
49. Hammoud Z. и др. Cyclodextrin-membrane interaction in drug delivery and membrane structure maintenance // Int. J. Pharm. 2019. Т. 564. С. 59–76.
50. Gharib R. и др. Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes as a carrier system for volatile essential oil components: Application to anethole // Food Chem. 2017. Т. 218. С. 365–371.
51. Wang W.-X., Feng S.-S., Zheng C.-H. A comparison between conventional liposome and drug-cyclodextrin complex in liposome system // Int. J. Pharm. 2016. Т. 513, № 1–2. С. 387–392.
52. Fernández-Romero A.-M. и др. Novel Findings about Double-Loaded Curcumin-in-HPβcyclodextrin-in Liposomes: Effects on the Lipid Bilayer and Drug Release // Pharmaceutics. 2018. Т. 10, № 4. С. 256.
53. Kauscher U. и др. Incorporation of Amphiphilic Cyclodextrins into Liposomes as Artificial Receptor Units // Langmuir. 2013. Т. 29, № 24. С. 7377–7383.
54. He Y. и др. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy // Micron. 2008. Т. 39, № 5. С. 495–516.
55. Saenger W. и др. Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger AnaloguesBeyond the Doughnut // Chem. Rev. 1998. Т. 98, № 5. С. 1787–1802.
56. Zhou C. и др. Self-Assembly of Channel Type β-CD Dimers Induced by Dodecane // Sci. Rep. 2014. Т. 4, № 1. С. 7533.

57. Kou X. и др. Cyclodextrins-amphiphile molecules supramolecular self-assemblies: Mechanisms, characterization, and applications in advanced functional materials // Adv. Colloid Interface Sci. 2025. Т. 346. С. 103676.
58. Shigemitsu H., Kida T. Preparation of nano- and microstructures through molecular assembly of cyclic oligosaccharides // Polym. J. 2018. Т. 50, № 8. С. 541–550.
59. Borkovec M., Koper G. J. M., Spiess B. The intrinsic view of ionization equilibria of polyprotic molecules // New J. Chem. 2014. Т. 38, № 12. С. 5679–5685.
60. Salehzadeh S., Gholiee Y., Bayat M. Prediction of microscopic protonation constants of polybasic molecules via computational methods: A complete microequilibrium analysis of spermine // Int. J. Quantum Chem. 2011. Т. 111, № 14. С. 3608–3615.
61. Salehzadeh S., Yaghoobi F., Bayat M. Illustration of all species and all microspecies involved in full protonation steps of spermine and determination of corresponding most abundant and most stable conformers, a gas phase theoretical study // Chem. Phys. 2009. Т. 361, № 1–2. С. 18–26.
62. Sagar N. A. и др. Polyamines: Functions, Metabolism, and Role in Human Disease Management // Medical Sciences. 2021. Т. 9, № 2. С. 44.
63. Korolev N. A molecular dynamics simulation study of oriented DNA with polyamine and sodium counterions: diffusion and averaged binding of water and cations // Nucleic Acids Res. 2003. Т. 31, № 20. С. 5971–5981.
64. Schuber F. и др. Polyamines as modulators of membrane fusion: aggregation and fusion of liposomes // Biochemistry. 1983. Т. 22, № 26. С. 6134–6140.
65. Meers P. и др. Spermine as a modulator of membrane fusion: interactions with acidic phospholipids // Biochemistry. 1986. Т. 25, № 11. С. 3109–3118.
66. Chung L. и др. Interaction of gentamicin and spermine with bilayer membranes containing negatively charged phospholipids // Biochemistry. 1985. Т. 24, № 2. С. 442–452.
67. Kim V. P. и др. Planar nanosystems on the basis of complexes formed by amphiphilic polyamine, magnetite nanoparticles, and DNA molecules // Nanotechnol. Russ. 2014. Т. 9, № 5–6. С. 280–287.

68. Iacomino G., Picariello G., D'Agostino L. DNA and nuclear aggregates of polyamines // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2012. Т. 1823, № 10. С. 1745–1755.
69. Zhao C. и др. Polyamine metabolism controls B-to-Z DNA transition to orchestrate DNA sensor cGAS activity // Immunity. 2023. Т. 56, № 11. С. 2508-2522.e6.
70. Raspaud E. и др. Spermine-Induced Aggregation of DNA, Nucleosome, and Chromatin // Biophys. J. 1999. Т. 77, № 3. С. 1547–1555.
71. Ouameur A. A., Tajmir-Riahi H.-A. Structural Analysis of DNA Interactions with Biogenic Polyamines and Cobalt(III)hexamine Studied by Fourier Transform Infrared and Capillary Electrophoresis // Journal of Biological Chemistry. 2004. Т. 279, № 40. С. 42041–42054.
72. Igarashi K., Kashiwagi K. The functional role of polyamines in eukaryotic cells // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2019. Т. 107. С. 104–115.
73. Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2010. Т. 42, № 1. С. 39–51.
74. Dever T. E., Ivanov I. P. Roles of polyamines in translation // Journal of Biological Chemistry. 2018. Т. 293, № 48. С. 18719–18729.
75. Nichols C. G., Lee S. Polyamines and potassium channels: A 25-year romance // Journal of Biological Chemistry. 2018. Т. 293, № 48. С. 18779–18788.
76. Guo D., Lu Z. Mechanism of Irk1 Channel Block by Intracellular Polyamines // J. Gen. Physiol. 2000. Т. 115, № 6. С. 799–814.
77. Oliver D., Baukrowitz T., Fakler B. Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K^+ channels // Eur. J. Biochem. 2000. Т. 267, № 19. С. 5824–5829.
78. Rider J. E. и др. Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide // Amino Acids. 2007. Т. 33, № 2. С. 231–240.
79. Ha H. C. и др. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998. Т. 95, № 19. С. 11140–11145.

80. PEDRENO E. и др. Protecting or promoting effects of spermine on DNA strand breakage induced by iron or copper ions as a function of metal concentration // J. Inorg. Biochem. 2005. Т. 99, № 10. С. 2074–2080.
81. Wang L. и др. Spermine enhances antiviral and anticancer responses by stabilizing DNA binding with the DNA sensor cGAS // Immunity. 2023. Т. 56, № 2. С. 272-288.e7.
82. Zahedi K., Barone S., Soleimani M. Polyamines and Their Metabolism: From the Maintenance of Physiological Homeostasis to the Mediation of Disease // Medical Sciences. 2022. Т. 10, № 3. С. 38.
83. Delcros J.-G. и др. Effect of Spermine Conjugation on the Cytotoxicity and Cellular Transport of Acridine // J. Med. Chem. 2002. Т. 45, № 23. С. 5098–5111.
84. Liao C.-P. и др. Polyamine Transport as a Target for Treatment of *Pneumocystis* Pneumonia // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. Т. 53, № 12. С. 5259–5264.
85. Niyomtham N. и др. Synthesis and in vitro transfection efficiency of spermine-based cationic lipids with different central core structures and lipophilic tails // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015. Т. 25, № 3. С. 496–503.
86. Jin Y. и др. Role of Hydrophobic Modification in Spermine-Based Poly(β-amino ester)s for siRNA Delivery and Their Spray-Dried Powders for Inhalation and Improved Storage // Biomacromolecules. 2024. Т. 25, № 7. С. 4177–4191.
87. Hartig S. M. и др. Kinetic analysis of nanoparticulate polyelectrolyte complex interactions with endothelial cells // Biomaterials. 2007. Т. 28, № 26. С. 3843–3855.
88. Makhlof A. и др. A mucoadhesive nanoparticulate system for the simultaneous delivery of macromolecules and permeation enhancers to the intestinal mucosa // Journal of Controlled Release. 2011. Т. 149, № 1. С. 81–88.
89. Van Meer G., Voelker D. R., Feigenson G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. Т. 9, № 2. С. 112–124.
90. Israelachvili J. N., Mitchell D. J., Ninham B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers // Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2. 1976. Т. 72. С. 1525.

91. Levin Y. Electrostatic correlations: from plasma to biology // Reports on Progress in Physics. 2002. Т. 65, № 11. С. 1577–1632.
92. Cross S. N., Al-Feghali A. H., Blum A. S. Interactions of Common Biological Buffers with Iron Oxide Nanoparticles // Langmuir. 2023. Т. 39, № 22. С. 7632–7641.
93. Velikonja A. и др. Interaction between Dipolar Lipid Headgroups and Charged Nanoparticles Mediated by Water Dipoles and Ions // Int. J. Mol. Sci. 2013. Т. 14, № 8. С. 15312–15329.
94. Cámara C. I. и др. Interaction of magnetic nanoparticles with phospholipid films adsorbed at a liquid/liquid interface // Physical Chemistry Chemical Physics. 2015. Т. 17, № 1. С. 414–421.
95. Wang B. и др. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. Т. 105, № 47. С. 18171–18175.
96. Schulz M., Olubummo A., Binder W. H. Beyond the lipid-bilayer: interaction of polymers and nanoparticles with membranes // Soft Matter. 2012. Т. 8, № 18. С. 4849.
97. Arvizo R. R. и др. Effect of Nanoparticle Surface Charge at the Plasma Membrane and Beyond // Nano Lett. 2010. Т. 10, № 7. С. 2543–2548.
98. Record M. T., Anderson C. F., Lohman T. M. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity // Q. Rev. Biophys. 1978. Т. 11, № 2. С. 103–178.
99. Xu X. и др. Counterion-Release Entropy Governs the Inhibition of Serum Proteins by Polyelectrolyte Drugs // Biomacromolecules. 2018. Т. 19, № 2. С. 409–416.
100. Eisenberg D., McLachlan A. D. Solvation energy in protein folding and binding // Nature. 1986. Т. 319, № 6050. С. 199–203.
101. Coehn A. Ueber ein Gesetz der Electricitätserregung // Ann. Phys. 1898. Т. 300, № 2. С. 217–232.

102. Ermakov Y. Electric Fields at the Lipid Membrane Interface // Membranes (Basel). 2023. Т. 13, № 11. С. 883.
103. Born M. Volumen und Hydratationswärme der Ionen // Zeitschrift für Physik. 1920. Т. 1, № 1. С. 45–48.
104. Kariuki R. и др. Interactions of nanoparticles with living and synthetic bio-membranes // Chem. Soc. Rev. 2025. Т. 54, № 22. С. 10531–10615.
105. Zha S. и др. Functionalized Nanomaterials Capable of Crossing the Blood–Brain Barrier // ACS Nano. 2024. Т. 18, № 3. С. 1820–1845.
106. Zanella D. и др. The direct permeation of nanoparticles through the plasma membrane transiently modifies its properties // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2019. Т. 1861, № 10. С. 182997.
107. Zhang S., Gao H., Bao G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis // ACS Nano. 2015. Т. 9, № 9. С. 8655–8671.
108. Pandit R., Chen L., Götz J. The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. 2020. Т. 165–166. С. 1–14.
109. Chen S. и др. Effect of Cationic Charge Density on Transcytosis of Polyethylenimine // Biomacromolecules. 2021. Т. 22, № 12. С. 5139–5150.
110. Zhang W. и др. Differential expression of receptors mediating receptor-mediated transcytosis (RMT) in brain microvessels, brain parenchyma and peripheral tissues of the mouse and the human // Fluids Barriers CNS. 2020. Т. 17, № 1. С. 47.
111. Villaseñor R. и др. Intracellular transport and regulation of transcytosis across the blood–brain barrier // Cellular and Molecular Life Sciences. 2019. Т. 76, № 6. С. 1081–1092.
112. Rothen-Rutishauser B. M. и др. Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques // Environ. Sci. Technol. 2006. Т. 40, № 14. С. 4353–4359.
113. Geiser M. и др. Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells // Environ. Health Perspect. 2005. Т. 113, № 11. С. 1555–1560.

114. Uehara T. M. и др. A Detailed Investigation on the Interactions between Magnetic Nanoparticles and Cell Membrane Models // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2013. Т. 5, № 24. С. 13063–13068.
115. Piosik E. и др. Effect of Aminated Chitosan-Coated Fe3O4 Nanoparticles with Applicational Potential in Nanomedicine on DPPG, DSPC, and POPC Langmuir Monolayers as Cell Membrane Models // Int. J. Mol. Sci. 2021. Т. 22, № 5. С. 2467.
116. Laurencin M. и др. Interactions Between Giant Unilamellar Vesicles and Charged Core−Shell Magnetic Nanoparticles // Langmuir. 2010. Т. 26, № 20. С. 16025–16030.
117. Le Bihan O. и др. Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome // J. Struct. Biol. 2009. Т. 168, № 3. С. 419–425.
118. Deserno M. When do fluid membranes engulf sticky colloids? // Journal of Physics: Condensed Matter. 2004. Т. 16, № 22. С. S2061–S2070.
119. Noguchi H., Takasu M. Adhesion of Nanoparticles to Vesicles: A Brownian Dynamics Simulation // Biophys. J. 2002. Т. 83, № 1. С. 299–308.
120. Roiter Y. и др. Interaction of Nanoparticles with Lipid Membrane // Nano Lett. 2008. Т. 8, № 3. С. 941–944.
121. Zhang H. и др. Cooperative Transmembrane Penetration of Nanoparticles // Sci. Rep. 2015. Т. 5, № 1. С. 10525.
122. Nakamura H. и др. Direct translocation of nanoparticles across a model cell membrane by nanoparticle-induced local enhancement of membrane potential // Physical Chemistry Chemical Physics. 2019. Т. 21, № 35. С. 18830–18838.
123. Lopez-Barbosa N. и др. Magnetite–OmpA Nanobioconjugates as Cell-Penetrating Vehicles with Endosomal Escape Abilities // ACS Biomater. Sci. Eng. 2020. Т. 6, № 1. С. 415–424.
124. Amstad E. и др. Triggered Release from Liposomes through Magnetic Actuation of Iron Oxide Nanoparticle Containing Membranes // Nano Lett. 2011. Т. 11, № 4. С. 1664–1670.

125. Gulyaev Y. и др. Changes of the structure and permeability of lipid membranes caused by nanoparticles and pulsed electromagnetic effects // Izvestiya VUZ. Applied Nonlinear Dynamics. 2025.
126. Khuntawee W. и др. Molecular Dynamics Simulations of the Interaction of Beta Cyclodextrin with a Lipid Bilayer // J. Chem. Inf. Model. 2015. Т. 55, № 9. С. 1894–1902.
127. Leclercq L. Interactions between cyclodextrins and cellular components: Towards greener medical applications? // Beilstein Journal of Organic Chemistry. 2016. Т. 12. С. 2644–2662.
128. Shiotani K. и др. Differential Effects of Sulfate and Sulfobutyl Ether of β-Cyclodextrin on Erythrocyte Membranes in Vitro // Pharm. Res. 1995. Т. 12, № 1. С. 78–84.
129. Wang M. и др. Transforms of Cell Surface Glycoproteins Charge Influences Tumor Cell Metastasis via Atypically Inhibiting Epithelial-Mesenchymal Transition Including Matrix Metalloproteinases and Cell Junctions // Bioconjug. Chem. 2023. Т. 34, № 8. С. 1498–1507.
130. Mavridis I. M., Yannakopoulou K. Anionic cyclodextrins as versatile hosts for pharmaceutical nanotechnology: Synthesis, drug delivery, enantioselectivity, contrast agents for MRI // Int. J. Pharm. 2015. Т. 492, № 1–2. С. 275–290.
131. Huang Z., London E. Effect of Cyclodextrin and Membrane Lipid Structure upon Cyclodextrin–Lipid Interaction // Langmuir. 2013. Т. 29, № 47. С. 14631–14638.
132. Visco I., Chiantia S., Schwille P. Asymmetric Supported Lipid Bilayer Formation via Methyl-β-Cyclodextrin Mediated Lipid Exchange: Influence of Asymmetry on Lipid Dynamics and Phase Behavior // Langmuir. 2014. Т. 30, № 25. С. 7475–7484.
133. Puglisi G., Fresta M., Ventura C. A. Interaction of Natural and Modified β-Cyclodextrins with a Biological Membrane Model of Dipalmitoylphosphatidylcholine // J. Colloid Interface Sci. 1996. Т. 180, № 2. С. 542–547.
134. Giocondi M.-C. и др. Use of Cyclodextrin for AFM Monitoring of Model Raft Formation // Biophys. J. 2004. Т. 86, № 2. С. 861–869.

135. Biswas A. и др. Cholesterol Depletion by MβCD Enhances Cell Membrane Tension and Its Variations-Reducing Integrity // Biophys. J. 2019. Т. 116, № 8. С. 1456–1468.
136. Suresh P., London E. Using cyclodextrin-induced lipid substitution to study membrane lipid and ordered membrane domain (raft) function in cells // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2022. Т. 1864, № 1. С. 183774.
137. Grammenos A. и др. ESR technique for noninvasive way to quantify cyclodextrins effect on cell membranes // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. Т. 398, № 3. С. 350–354.
138. Wang H. и др. Evaluation of cholesterol depletion as a marker of nephrotoxicity in vitro for novel β-cyclodextrin derivatives // Food and Chemical Toxicology. 2011. Т. 49, № 6. С. 1387–1393.
139. López C. A., de Vries A. H., Marrink S. J. Molecular Mechanism of Cyclodextrin Mediated Cholesterol Extraction // PLoS Comput. Biol. 2011. Т. 7, № 3. С. e1002020.
140. Roux M. и др. Cyclodextrin-Induced Lipid Lateral Separation in DMPC Membranes: 2H Nuclear Magnetic Resonance Study // Biophys. J. 2002. Т. 82, № 2. С. 813–822.
141. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media // IEEE Trans. Magn. 1981. Т. 17, № 2. С. 1247–1248.
142. Anosov A. A. и др. Magnetite nanoparticles increase the conductivity of azolectin bilayer in an inhomogeneous magnetic field // Journal of Radio Electronics. 2023. Т. 2023, № 12.
143. Vikesland P. J. и др. Aggregation and sedimentation of magnetite nanoparticle clusters // Environ. Sci. Nano. 2016. Т. 3, № 3. С. 567–577.
144. DIXON D. Colour and turbidity removal with reusable magnetite particles—VIIA colloid chemistry study of the effect of inorganic ions on the efficiency of clarification // Water Res. 1984. Т. 18, № 5. С. 529–534.

145. Sherwood J. и др. Surface functionalization of dopamine coated iron oxide nanoparticles for various surface functionalities // J. Magn. Magn. Mater. 2017. Т. 427. С. 220–224.
146. Spiridonov V. и др. Magnetosensitive Water-Soluble Nanocomposite Based on Sodium Alginate and Fe2O3 Nanoparticles // Macromol. Symp. Wiley-VCH Verlag, 2020. Т. 389, № 1.
147. Spiridonov V. и др. Doxorubicin Loaded Magnetosensitive Water-Soluble Nanogel Based on NIPAM and Iron (3+) Containing Nanoparticles // Macromol. Symp. 2020. Т. 389, № 1.
148. Sybachin A., Pigareva V. Ensembles of carboxymethyl cyclodextrins on cationic liposomes as highly efficient nanocontainers for the delivery of hydrophobic compounds // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2023. Т. 1867, № 6. С. 130363.
149. Gorin D. A. и др. Effect of microwave irradiation on composite iron oxide nanoparticle/polymer microcapsules / под ред. Zimnyakov D. A., Khlebtsov N. G. 2007. С. 653604-653604–653610.
150. Koksharov Yu. A. и др. Low temperature electron paramagnetic resonance anomalies in Fe-based nanoparticles // J. Appl. Phys. 2000. Т. 88, № 3. С. 1587–1592.
151. Anosov A. A. и др. Estimation of the parameters of the Smoluchowski equation describing the occurrence of pores in a bilayer lipid membrane under soft poration // The European Physical Journal E. 2020. Т. 43, № 10. С. 66.
152. Mueller P. и др. Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System // Nature. 1962. Т. 194, № 4832. С. 979–980.
153. Grant G. T. и др. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model // FEBS Lett. 1973. Т. 32, № 1. С. 195–198.
154. Lukmanova A. R. и др. Approach to Quantitative Assessment of the Interaction of Nanocontainers Based on Natural Anionic Polysaccharides Cross-Linked with

Divalent Metal Ions and Drug Doxorubicin // Moscow University Chemistry Bulletin. 2025. Т. 80, № 4. С. 223–226.

155. De Stefano C. и др. Sequestration of biogenic amines by alginic and fulvic acids // Biophys. Chem. 2006. Т. 122, № 3. С. 221–231.
156. Arkaban H. и др. Polyacrylic Acid Nanoplatforms: Antimicrobial, Tissue Engineering, and Cancer Theranostic Applications // Polymers (Basel). 2022. Т. 14, № 6. С. 1259.
157. Nishida C. и др. Effect of Different Molecular Weights of Polyacrylic Acid on Rat Lung Following Intratracheal Instillation // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23, № 18. С. 10345.
158. Kausar A. Poly(acrylic acid) nanocomposites: Design of advanced materials // Journal of Plastic Film & Sheeting. 2021. Т. 37, № 4. С. 409–428.
159. Mechtaeva E. V. и др. Polyelectrolyte complexes of polyacrylic acid with oligovalent organic counterions // J. Mol. Liq. 2019. Т. 293. С. 111418.
160. Zhou J., Barz M., Schmid F. Complex formation between polyelectrolytes and oppositely charged oligoelectrolytes // J. Chem. Phys. 2016. Т. 144, № 16.
161. Solis F. J., de la Cruz M. O. Collapse of flexible polyelectrolytes in multivalent salt solutions // J. Chem. Phys. 2000. Т. 112, № 4. С. 2030–2035.
162. D'Angelo N. A. и др. Doxorubicin nanoformulations on therapy against cancer: An overview from the last 10 years // Biomaterials Advances. 2022. Т. 133. С. 112623.
163. Fiallo M. M. L. и др. Circular Dichroism Studies on Anthracycline Antitumor Compounds. Relationship between the Molecular Structure and the Spectroscopic Data // J. Pharm. Sci. 1998. Т. 87, № 8. С. 967–975.
164. Anand R. и др. β-Cyclodextrin polymer nanoparticles as carriers for doxorubicin and artemisinin: a spectroscopic and photophysical study // Photochemical & Photobiological Sciences. 2012. Т. 11, № 8. С. 1285–1292.
165. Kusaia V. S. и др. Synthesis of Magneto-Controllable Polymer Nanocarrier Based on Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic Acid) for Doxorubicin Immobilization // Polymers (Basel). 2022. Т. 14, № 24. С. 5440.

166. Agrawal P., Barthwal S. K., Barthwal R. Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry // Eur. J. Med. Chem. 2009. Т. 44, № 4. С. 1437–1451.
167. Spiridonov V. V. и др. Magneto-sensitive hybrid nanocomposites of water-soluble sodium alginate cross-linked with calcium ions and maghemite // Express Polym. Lett. 2018. Т. 12, № 5. С. 452–461.
168. Marianelli A. M., Miller B. M., Keating C. D. Impact of macromolecular crowding on RNA/spermine complex coacervation and oligonucleotide compartmentalization // Soft Matter. 2018. Т. 14, № 3. С. 368–378.
169. Banani S. F. и др. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. Т. 18, № 5. С. 285–298.
170. Hyman A. A., Weber C. A., Jülicher F. Liquid-Liquid Phase Separation in Biology // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2014. Т. 30, № 1. С. 39–58.
171. Alfano C. и др. Molecular Crowding: The History and Development of a Scientific Paradigm // Chem. Rev. 2024. Т. 124, № 6. С. 3186–3219.
172. Pigareva V. и др. Adsorption of Carboxymethylcyclodextrins on Cationic Liposomes as a Route for Preparation of Capacious Nanocontainers for the Hydrophobic Molecules // Macromol. Symp. 2024. Т. 413, № 3.
173. Renault A. и др. Surface-Induced Polymerization of Actin // Biophys. J. 1999. Т. 76, № 3. С. 1580–1590.
174. Richter R. P. и др. On the Kinetics of Adsorption and Two-Dimensional Self-Assembly of Annexin A5 on Supported Lipid Bilayers // Biophys. J. 2005. Т. 89, № 5. С. 3372–3385.
175. Weikl T. R. Membrane-Mediated Cooperativity of Proteins // Annu. Rev. Phys. Chem. 2018. Т. 69, № 1. С. 521–539.
176. Ito H., Higuchi Y., Shimokawa N. Coarse-grained molecular dynamics simulation of binary charged lipid membranes: Phase separation and morphological dynamics // Phys. Rev. E. 2016. Т. 94, № 4. С. 042611.

177. Haleva E., Ben-Tal N., Diamant H. Increased Concentration of Polyvalent Phospholipids in the Adsorption Domain of a Charged Protein // Biophys. J. 2004. Т. 86, № 4. С. 2165–2178.
178. Shi X., Ma Y. Effective attraction interactions between like-charge macroions bound to binary fluid lipid membranes // J. Chem. Phys. 2007. Т. 126, № 12.
179. Ellenbroek W. G. и др. Divalent Cation-Dependent Formation of Electrostatic PIP2 Clusters in Lipid Monolayers // Biophys. J. 2011. Т. 101, № 9. С. 2178–2184.
180. Kaszuba M. и др. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques // Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. 2010. Т. 368, № 1927. С. 4439–4451.
181. Kestin J., Sokolov M., Wakeham W. A. Viscosity of liquid water in the range −8 °C to 150 °C // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1978. Т. 7, № 3. С. 941–948.
182. Deng M. и др. cDPD: A new dissipative particle dynamics method for modeling electrokinetic phenomena at the mesoscale // J. Chem. Phys. 2016. Т. 145, № 14.
183. Derjaguin B., Landau L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes // Prog. Surf. Sci. 1993. Т. 43, № 1–4. С. 30–59.
184. Bondar O. V. и др. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers // Acta Naturae. 2012. Т. 4, № 1. С. 78–81.
185. Ma Y. и др. Introducing Membrane Charge and Membrane Potential to T Cell Signaling // Front. Immunol. 2017. Т. 8.
186. Decher G., Hong J. D. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: II. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces // Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie. 1991. Т. 95, № 11. С. 1430–1434.
187. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites // Science (1979). 1997. Т. 277, № 5330. С. 1232–1237.

188. Habeeb I. F. и др. When a negative (charge) is not a positive: sialylation and its role in cancer mechanics and progression // Front. Oncol. 2024. Т. 14.
189. Saulite L. и др. Nanoparticle delivery to metastatic breast cancer cells by nanoengineered mesenchymal stem cells // Beilstein Journal of Nanotechnology. 2018. Т. 9. С. 321–332.
190. Pribil M., Labs M., Leister D. Structure and dynamics of thylakoids in land plants // J. Exp. Bot. 2014. Т. 65, № 8. С. 1955–1972.
191. Vershubskii A. V. и др. Lateral heterogeneity of the proton potential along the thylakoid membranes of chloroplasts // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2017. Т. 1859, № 3. С. 388–401.
192. Lee D. W. и др. Lipid domains control myelin basic protein adsorption and membrane interactions between model myelin lipid bilayers // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014. Т. 111, № 8.
193. Matsuoka K. и др. COPII-Coated Vesicle Formation Reconstituted with Purified Coat Proteins and Chemically Defined Liposomes // Cell. 1998. Т. 93, № 2. С. 263–275.
194. Spiridonov V. V. и др. The one-step synthesis of polymer-based magnetic γ-Fe2O3/carboxymethyl cellulose nanocomposites // Carbohydr. Polym. 2017. Т. 177. С. 269–274.
195. Mendelsohn R., Mao G., Flach C. R. Infrared reflection–absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid–protein interaction in Langmuir films // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2010. Т. 1798, № 4. С. 788–800.
196. Kręcisz M. и др. Interactions between magnetic nanoparticles and model lipid bilayers—Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) studies of the molecular basis of nanotoxicity // J. Appl. Phys. 2016. Т. 120, № 12.
197. Weinstein D. B. и др. Membranes of animal cells. IV. Lipids of the L cell and its surface membrane. // J. Biol. Chem. 1969. Т. 244, № 15. С. 4103–4111.

198. Le-Deygen I. M. и др. Magnetic nanorods for remote disruption of lipid membranes by non-heating low frequency magnetic field // Nanomedicine. 2019. Т. 21. С. 102065.
199. Дейген И. М., Кудряшова Е. В. Структура и стабильность анионных липосом в комплексе с сополимером PEG-хитозан // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40, № 5. С. 595–607.
200. Atkins P. W. ., De Paula Julio. Atkins' Physical chemistry. W.H. Freeman, 2006. 1053 с.
201. Stepanova D. A. и др. Ultrasonic Film Rehydration Synthesis of Mixed Polylactide Micelles for Enzyme-Resistant Drug Delivery Nanovehicles // Polymers (Basel). 2022. Т. 14, № 19. С. 4013.
202. Fernández D. P. и др. A Formulation for the Static Permittivity of Water and Steam at Temperatures from 238 K to 873 K at Pressures up to 1200 MPa, Including Derivatives and Debye–Hückel Coefficients // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1997. Т. 26, № 4. С. 1125–1166.
203. Huang Y., Lapitsky Y. Salt-Assisted Mechanistic Analysis of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogel Formation // Biomacromolecules. 2012. Т. 13, № 11. С. 3868–3876.
204. Huang Y., Lapitsky Y. On the kinetics of chitosan/tripolyphosphate micro- and nanogel aggregation and their effects on particle polydispersity // J. Colloid Interface Sci. 2017. Т. 486. С. 27–37.
205. Gummel J. и др. Finite size and inner structure controlled by electrostatic screening in globular complexes of proteins and polyelectrolytes // Soft Matter. 2008. Т. 4, № 8. С. 1653.
206. Bell G. M., Levine S., McCartney L. N. Approximate methods of determining the double-layer free energy of interaction between two charged colloidal spheres // J. Colloid Interface Sci. 1970. Т. 33, № 3. С. 335–359.
207. Hamaker H. C. The London—van der Waals attraction between spherical particles // Physica. 1937. Т. 4, № 10. С. 1058–1072.

208. Rocher-Casterline B. E. и др. Communication: Determination of the bond dissociation energy (*D*) of the water dimer, (H2O)2, by velocity map imaging // J. Chem. Phys. 2011. Т. 134, № 21.
209. Zhang H. и др. Molecular Recognition in Different Environments: β-Cyclodextrin Dimer Formation in Organic Solvents // J. Phys. Chem. B. 2012. Т. 116, № 42. С. 12684–12693.
210. Pu H. и др. Preparation of a carboxymethyl β-cyclodextrin polymer and its rapid adsorption performance for basic fuchsin // RSC Adv. 2020. Т. 10, № 35. С. 20905–20914.
211. Michel R., Gradzielski M. Experimental Aspects of Colloidal Interactions in Mixed Systems of Liposome and Inorganic Nanoparticle and Their Applications // Int. J. Mol. Sci. 2012. Т. 13, № 9. С. 11610–11642.
212. Faure B., Salazar-Alvarez G., Bergström L. Hamaker Constants of Iron Oxide Nanoparticles // Langmuir. 2011. Т. 27, № 14. С. 8659–8664.
213. Man D., Pytel B. Effect of Ionic and Nonionic Compounds Structure on the Fluidity of Model Lipid Membranes: Computer Simulation and EPR Experiment // Membranes (Basel). 2024. Т. 14, № 12. С. 257.
214. Wohlert J., Edholm O. The Range and Shielding of Dipole-Dipole Interactions in Phospholipid Bilayers // Biophys. J. 2004. Т. 87, № 4. С. 2433–2445.
215. Gurtovenko A. A., Vattulainen I. Membrane Potential and Electrostatics of Phospholipid Bilayers with Asymmetric Transmembrane Distribution of Anionic Lipids // J. Phys. Chem. B. 2008. Т. 112, № 15. С. 4629–4634.
216. Yang J. и др. Specific Ion Binding at Phospholipid Membrane Surfaces // J. Chem. Theory Comput. 2015. Т. 11, № 9. С. 4495–4499.
217. Yoon S.-Y. и др. Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies for phosphate adsorption to magnetic iron oxide nanoparticles // Chemical Engineering Journal. 2014. Т. 236. С. 341–347.
218. Abdala D. B. и др. Surface loading effects on orthophosphate surface complexation at the goethite/water interface as examined by extended X-ray Absorption Fine

Structure (EXAFS) spectroscopy // J. Colloid Interface Sci. 2015. Т. 437. С. 297–303.

219. Simon S. A. и др. The hydration pressure between lipid bilayers. Comparison of measurements using x-ray diffraction and calorimetry // Biophys. J. 1991. Т. 59, № 3. С. 538–546.
220. Koch A. H. R. и др. Probing Nanoparticle/Membrane Interactions by Combining Amphiphilic Diblock Copolymer Assembly and Plasmonics // J. Phys. Chem. B. 2020. Т. 124, № 5. С. 742–750.
221. Helfrich W. Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments // Zeitschrift für Naturforschung C. 1973. Т. 28, № 11–12. С. 693–703.
222. Phillips R. и др. Physical Biology of the Cell. Garland Science, 2012.
223. Hu M., Briguglio J. J., Deserno M. Determining the Gaussian Curvature Modulus of Lipid Membranes in Simulations // Biophys. J. 2012. Т. 102, № 6. С. 1403–1410.
224. Kozlov M. M., Chernomordik L. V. Membrane tension and membrane fusion // Curr. Opin. Struct. Biol. 2015. Т. 33. С. 61–67.
225. Terzi M. M., Deserno M., Nagle J. F. Mechanical properties of lipid bilayers: a note on the Poisson ratio // Soft Matter. 2019. Т. 15, № 44. С. 9085–9092.
226. Vácha R., Martinez-Veracoechea F. J., Frenkel D. Receptor-Mediated Endocytosis of Nanoparticles of Various Shapes // Nano Lett. 2011. Т. 11, № 12. С. 5391–5395.
227. Curtis E. M. и др. Modeling nanoparticle wrapping or translocation in bilayer membranes // Nanoscale. 2015. Т. 7, № 34. С. 14505–14514.
228. Kozlovsky Y., Kozlov M. M. Membrane Fission: Model for Intermediate Structures // Biophys. J. 2003. Т. 85, № 1. С. 85–96.
229. Różycki B. и др. Membrane-Elasticity Model of Coatless Vesicle Budding Induced by ESCRT Complexes // PLoS Comput. Biol. 2012. Т. 8, № 10. С. e1002736.
230. Cocucci E., Gaudin R., Kirchhausen T. Dynamin recruitment and membrane scission at the neck of a clathrin-coated pit // Mol. Biol. Cell. 2014. Т. 25, № 22. С. 3595–3609.
231. Hoiles W. и др. An Engineered Membrane to Measure Electroporation: Effect of Tethers and Bioelectronic Interface // Biophys. J. 2014. Т. 107, № 6. С. 1339–1351.

232. Wang H. и др. DLVO interaction energies between hollow nanoparticles and fractal surfaces // Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 2025. Т. 708. С. 135923.
233. Gentili D., Ori G. Reversible assembly of nanoparticles: theory, strategies and computational simulations // Nanoscale. 2022. Т. 14, № 39. С. 14385–14432.
234. Lee K. W., Chen H. Coagulation Rate of Polydisperse Particles // Aerosol Science and Technology. 1984. Т. 3, № 3. С. 327–334.
235. Li W. и др. Aqueous Aggregation and Surface Deposition Processes of Engineered Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Environmental Applications // Environ. Sci. Technol. 2014. Т. 48, № 20. С. 11892–11900.
236. Jungblut S., Joswig J.-O., Eychmüller A. Diffusion- and reaction-limited cluster aggregation revisited // Physical Chemistry Chemical Physics. 2019. Т. 21, № 10. С. 5723–5729.
237. Fabris F. и др. Magnetic properties and dipolar interactions of Fe_3O_4 nanoparticle clusters produced by bottom-up self-assembly // J. Mater. Chem. C Mater. 2025. Т. 13, № 19. С. 9756–9767.
238. Serantes D., Baldomir D. Nanoparticle Size Threshold for Magnetic Agglomeration and Associated Hyperthermia Performance // Nanomaterials. 2021. Т. 11, № 11. С. 2786.
239. Mascolo M., Pei Y., Ring T. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases // Materials. 2013. Т. 6, № 12. С. 5549–5567.
240. Domínguez-García P., Melle S., Rubio M. A. Morphology of anisotropic chains in a magneto-rheological fluid during aggregation and disaggregation processes // J. Colloid Interface Sci. 2009. Т. 333, № 1. С. 221–229.
241. Baranau V., Tallarek U. Random-close packing limits for monodisperse and polydisperse hard spheres // Soft Matter. 2014. Т. 10, № 21. С. 3826.
242. Solov'yov I. A., Greiner W. Theoretical Analysis of an Iron Mineral-Based Magnetoreceptor Model in Birds // Biophys. J. 2007. Т. 93, № 5. С. 1493–1509.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Оценки изменений энергий при образовании полимерных комплексов ПАК и спермина

Аннотация. В данном приложении приведены оценки изменений энергий при образовании полимерных комплексов ПАК и спермина. Рассмотрены стадии последовательного во времени укрупнения комплексов как в результате их агрегации, так и в результате включения новых полимерных цепей в состав комплексов в результате их связывания.

При массе мономерного звена ПАК $M_{зв} = 94$ Да число звеньев в цепи с молекулярной массой $M_{пол}$ можно оценить как

$$N_{зв} \simeq \frac{M_{пол}}{M_{зв}}. \quad (A.1)$$

Для ПАК 2100 Да, 8000 Да и 15000 Да получаются соответственно $N_{зв}$ 22, 85 и 160. Таким образом, число молекул спермина на одну цепь в комплексе составляет:

$$n_{сп,цеп} = \frac{N_{зв}}{R}, \quad (A.2)$$

что при $R = 15$ составляет приблизительно 2, 6 и 11 молекулы спермина на цепь ПАК 2100, 8000 и 15000 Да соответственно, и согласуется с литературными данными для схожих систем [159]. Методом светорассеяния с использованием диаграмм Зимма [201] были получены оценки порядка молекулярной массы полимерных комплексов $M_{комп} \sim 10^6$ Да. Тогда число мономерных звеньев в комплексе можно оценить как:

$$N_{зв,комп} \approx \frac{M_{комп}}{M_{зв} + \frac{M_{сп}}{R}} \approx 9 \times 10^3, \quad (A.3)$$

где $M_{сп} \approx 206$ Да – молекулярная масса протонированного спермина, $R = 15$.

Тогда характерное число полимерных цепей в одном комплексе

$$p \approx \frac{N_{зв,комп}}{N_{зв}} \quad (A.4)$$

имеет порядок 4×10^2, 1×10^2 и 6×10^1 для ПАК 2100 Да, 8000 Да и 15000 Да соответственно. Таким образом, полимерные комплексы состоят из десятков и сотен полимерных цепей, связанных между собой молекулами спермина. При этом из литературы известно, что образование ионных связей между молекулами полиаминов и молекулами ПАК может быть энергетически выгодно [155], что подтверждает направленность процесса комплексообразования.

Оценим остаточный заряд $Q_{\text{стех}}$ комплекса. Так как при pH = 7.2 степень ионизации карбоксильных групп ПАК $\alpha = 1$, а средний положительный заряд молекулы спермина $z_{\text{сп}} = 4$, то при $R = 15$ получаем $\alpha - \frac{z_{\text{сп}}}{R} \approx 0.73$, а остаточный заряд комплекса:

$$\frac{Q_{\text{стех}}}{e} = -N_{\text{зв,комп}}\left(\alpha - \frac{z_{\text{сп}}}{R}\right) \approx -6{,}8\times10^3 \qquad \text{(A.5)}$$

Таким образом, ~73 % карбоксильных групп полимера остаются нескомпенсированными.

При содержании 5 мг ПАК в 3 мл раствора концентрация мономерных звеньев составляет

$$c_0 \approx 17{,}7 \text{ ммоль/л.} \qquad \text{(A.6)}$$

Концентрация внесённого спермина составляет $c_{\text{сп}} = c_0/R \approx 1{,}18$ ммоль/л. В системе присутствуют противоионы Na^+ и Cl^- в тех же концентрациях. Тогда ионную силу в системе можно оценить как:

$$I = \frac{1}{2}\sum_i c_i z_i^2 = \frac{1}{2}(17{,}7 + 4{,}7) \approx 11{,}2 \ \frac{\text{ммоль}}{\text{л}}. \qquad \text{(A.7)}$$

В таком случае характерная длина экранирования в приближении Дебая-Хюккеля при $T = 298$ К и $\varepsilon_{\text{вод}} \approx 78{,}4$ [202] соответствует

$$\kappa^{-1} \simeq 2{,}9 \text{ нм.} \qquad \text{(A.8)}$$

Полученное значение характеризует оценку порядка величины в модели однородного эквивалентного электролита, при этом реальное распределение

противоионов в мягкой гидратированной полимерной матрице может быть неоднородным.

Механизм формирования полимерных комплексов определяется межмолекулярным и внутримолекулярным связыванием молекул полимера молекулами спермина. При этом процесс комплексообразования может проходить через стадию последовательного во времени укрупнения комплексов как в результате их агрегации, так и в результате включения новых полимерных цепей в состав комплексов в результате их связывания [203,204]. Ограничение роста комплексов может быть рассмотрено в контексте баланса энергетического выигрыша от образования «сшивок» и электростатического отталкивания свободного анионного полимерного звена, возрастающего при накоплении остаточного заряда комплексов, а также с точки зрения потери системой зарядовой коллоидной стабильности [205].

Рассмотрим процесс включения цепи ПАК в комплекс состава $R = 15$. Пусть n – число мономерных звеньев в присоединяемой цепи. Максимальное число новых ионных контактов при заданном составе равно

$$N_{\text{св}} = \frac{z_{\text{сп}}}{R} n, \tag{A.9}$$

а число нескомпенсированных отрицательных зарядов, вносимых новой цепью, составляет

$$z_{\text{ост}} = \left(1 - \frac{z_{\text{сп}}}{R}\right) n. \tag{A.10}$$

Работу внесения отрицательного заряда в отрицательный электростатический потенциал уже сформированного комплекса представим как положительный вклад $z_{\text{ост}} e|\Psi|$, где Ψ – эффективный потенциал комплекса. В качестве допущения примем $|\Psi| \approx |\zeta|$. Тогда свободная энергия включения новой цепи может быть записана как сумма энергетического выигрыша от образования новых контактов, электростатического барьера для внесения остаточного заряда и дополнительного вклада, включающего потерю трансляционной

и конформационной энтропии новой цепи и деформацию уже сформированной полимерной структуры:

$$\Delta G_{\text{вкл}} = -N_{\text{св}}\varepsilon_{\text{св}} + z_{\text{ост}} e|\Psi| + \Delta G_{\text{доп}}, \qquad \text{(A.11)}$$

где $\varepsilon_{\text{св}} > 0$ – энергетический выигрыш от образования ионного контакта в системе. $\varepsilon_{\text{св}}$ можно оценить как сумму кулоновского вклада от взаимодействия депротонированной карбоксильной группы и протонированной аминогруппы – $COO^{-}\cdots{}^{+}H–N$ и энтропийного вклада высвобождения противоионов при образовании связи.

Удельная, в расчёте на одно звено ПАК, свободная энергия включения новой цепи $\Delta g_{\text{вкл}}$:

$$\Delta g_{\text{вкл}} = -\frac{z_{\text{сп}}}{R}\varepsilon_{\text{св}} + \left(1 - \frac{z_{\text{сп}}}{R}\right) e|\Psi| + \Delta g_{\text{доп}}. \qquad \text{(A.12)}$$

Условие ограничения дальнейшего роста соответствует $\Delta g_{\text{вкл}} \geq 0$. В предельной оценке $\Delta g_{\text{доп}} = 0$ энергетический выигрыш на один контакт, который уравновешивается электростатическим вкладом, определяется соотношением

$$\varepsilon_{\text{бал}} = \frac{R - z_{\text{сп}}}{z_{\text{сп}}} e|\Psi|. \qquad \text{(A.13)}$$

При $T = 298$ К для комплексов состава R = 15, величины ζ-потенциала которых представлены на рисунке 3.1, $\varepsilon_{\text{бал}} \approx 4{,}8\ k_{\text{Б}}T$ для ПАК 2100 Да, $6{,}4\ k_{\text{Б}}T$ для ПАК 8000 Да и $4{,}8\ k_{\text{Б}}T$ для ПАК 15000 Да, соответственно. Эти величины являются оценкой масштаба суммарного энергетического выигрыша от встраивания новой цепочки ПАК и согласуются по порядку с литературными данными [99]. Так как энергия связывания сопоставима с величиной энергии тепловых флуктуаций, то остаточный заряд комплексов достаточен для остановки роста комплексов.

После ограничения включения новых полимерных цепей сформированные комплексы остаются отрицательно заряженными коллоидными частицами, взаимодействие которых можно рассмотреть в приближении теории Дерягина-Ландау-Вервея-Овербека (ДЛВО). В приближении взаимодействия двух одинаковых сферических частиц ван-дер-ваальсовский вклад в энергию

взаимодействия описывали выражением Гамакера, модифицированным из [206,207], а электростатический вклад, обусловленный перекрыванием электрических двойных слоёв, – в приближении взаимодействия сферических частиц с постоянным эффективным поверхностным потенциалом. Энергию Ван-дер-Ваальса можно записать так:

$$V_{\text{вдВ}}(h) = -\frac{A}{6}\left[\frac{2}{s^2+4s}+\frac{2}{s^2+4s+4}+\ln\left(\frac{s^2+4s}{s^2+4s+4}\right)\right], \qquad \text{(A.14)}$$

где $s = h/a$, a – радиус частицы, h – расстояние между поверхностями частиц, A – эффективная постоянная Гамакера. Электростатический вклад, обусловленный перекрыванием двойных электрических слоёв, рассчитывали при постоянном эффективном поверхностном потенциале. Ионный состав среды аппроксимировали симметричным 1:1-электролитом. В этом приближении электростатическая составляющая энергии взаимодействия имеет вид:

$$\begin{gathered} V_{эл}(h) = 64\pi a k_{\text{Б}} T n_{\infty} \kappa^{-2} \gamma^2 exp(-\kappa h), \\ \gamma = \tanh\left(\frac{e\psi_{\text{эфф}}}{4k_{\text{Б}}T}\right), \qquad n_{\infty} = 1000 N_{\text{A}} I, \end{gathered} \qquad \text{(A.15)}$$

а суммарная энергия взаимодействия:

$$V_{\text{сум}}(h) = V_{\text{эл}}(h)+V_{\text{вдВ}}(h). \qquad \text{(A.16)}$$

Для оценки масштаба электростатического отталкивания примем $a \approx R_{\text{h}}$ и $\psi_{\text{эфф}} \approx \zeta$. С учётом гидродинамических радиусов комплексов (рис. 3.1) при $I \approx 11{,}2$ ммоль/л и для выбранного расстояния $h = \lambda_{\text{D}} \approx 2{,}9$ нм получаем $V_{\text{эл}}$ порядка $2\times10^1\ k_{\text{Б}}T$, $1\times10^2\ k_{\text{Б}}T$ и $1\times10^2\ k_{\text{Б}}T$ соответственно. Таким образом, электростатического отталкивания полимерных комплексов достаточно для обеспечения зарядовой коллоидной стабильности системы. Важно, что для гидратированных полимерных частиц классическое приближение ДЛВО может не описывать количественно кинетику агрегации из-за мягкости частиц и неоднородности распределения заряда [204].

Таким образом, по мере укрупнения комплекса электростатическая работа включения дополнительного остаточного отрицательного заряда возрастает и может ограничивать дальнейшее включение полимерных цепей. После

формирования комплексов тот же остаточный заряд создаёт электростатическое отталкивание между коллоидными частицами и способствует сохранению их зарядовой коллоидной устойчивости. Баланс взаимодействий определяет размер и заряд полимерных комплексов.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Оценки изменений энергий, определяющих формирование надмолекулярных структур молекулами β-КМЦД на поверхности липидсодержащих систем

Аннотация. В приложении приведены оценки изменений энергий, определяющих формирование надмолекулярных структур β-КМЦД на поверхности липидсодержащих систем. Описана предполагаемая схема образования надмолекулярных структур.

Молекула β-КМЦД со степенью замещения 3 при физиологических условиях среды содержит три депротонированные карбоксильные группы и может образовывать от одного до трёх ионных контактов с положительно заряженными четвертичными аммониевыми группами ДОТАП. Известно, что в липидной мембране липиды могут образовывать кластеры [176–178]. Оценим суммарную энергию взаимодействия молекулы β-КМЦД с $x_{\text{ДОТАП}} = 0{,}3$ на основании оценок, приведённых в литературном обзоре:

$$\Delta G_{\text{n}} = n_{\text{ДОТАП}}\left(\Delta G_{\text{эл}}^{(1)} + \Delta G_{\text{пр}}^{(1)}\right) + \Delta G_{\text{дег}} + \Delta G_{\text{смеш}} + \Delta G_{\text{отт}}. \qquad \text{(Б.1)}$$

В рассматриваемом приближении кулоновский и энтропийный вклады относятся к одному ионному контакту и умножаются на число контактов. Дегидратационный вклад относится к общей молекулярной области взаимодействия и в данной оценке учитывается один раз. Величина $\Delta G_{\text{смеш}} > 0$ описывает затраты на латеральное смещение ДОТАП, а $\Delta G_{\text{отт}} > 0$ – взаимное отталкивание положительно заряженных групп ДОТАП. Локальное увеличение концентрации молекул ДОТАП в мембране состава $x_{\text{ДОТАП}} = 0{,}3$ приводит к уменьшению энтропии смешения:

$$\Delta G_{\text{смеш}} = n_{\text{ДОТАП}} k_{\text{Б}} T \ln\left(\frac{1}{x_{\text{ДОТАП}}}\right) \approx 1{,}2 n_{\text{ДОТАП}} k_{\text{В}} T. \qquad \text{(Б.2)}$$

Оценим энергию электростатического отталкивания между двумя соседними положительными головками ДОТАП в приближении Дебая-Хюккеля при $r = \kappa^{-1}$:

$$E_{\text{отт}}^{\text{пара}} \approx +0{,}33\, k_{\text{Б}} T. \qquad \text{(Б.3)}$$

Число пар положительных зарядов в группе из $n_{\text{ДОТАП}}$ равно $n_{\text{ДОТАП}}(n_{\text{ДОТАП}} - 1)/2$, поэтому

$$E_{\text{отт}} \approx 0{,}33 \frac{n_{\text{ДОТАП}}\left(n_{\text{ДОТАП}} - 1\right)}{2} k_{\text{Б}} T. \quad \text{(Б.4)}$$

Для кластера из двух молекул ДОТАП:

$$\Delta G_2 \approx -6{,}3 – 0{,}7\ k_{\text{Б}} T. \quad \text{(Б.5)}$$

Для кластера из трёх молекул ДОТАП:

$$\Delta G_3 \approx -10{,}0 – 1{,}6\ k_{\text{Б}} T. \quad \text{(Б.6)}$$

С учётом того, что одна молекула β-КМЦД может образовать до трёх электростатических контактов и то, что молекулы ДОТАП могут «мигрировать» в область взаимодействия с молекулой β-КМЦД, можно ожидать взаимодействия молекул β-КМЦД с кластерами из нескольких единиц молекул ДОТАП, что энергетически более выгодно, чем взаимодействие с единичными липидами. При этом в результате образования кластеров из ДОТАП их концентрация в остальных частях мембраны снижается, что уменьшает вероятность адгезии индивидуальных молекул β-КМЦД на мембрану вне кластеров. Выход электрофоретической подвижности на плато при сохранении положительного ζ-потенциала коллоида согласуется с насыщением доступных электростатических центров связывания при сохранении части катионных липидов в несвязанном состоянии.

Энергия электростатического взаимодействия молекул β-КМЦД с цвиттерионным ДОФХ и энергия от высвобождения пары противоионов $E_{\text{эл,ДОФХ}} \approx 0$, $\Delta G_{\text{пр,ДОФХ}} \approx 0$. Энергия образования водородных связей молекул β-КМЦД с полярными частями липидов не компенсирует потерь на энергию дегидратации молекулы ДОФХ, в результате чего $\Delta G_{\text{КМЦД-ДОФХ}} \approx 0$. В то же время из литературы известно, что молекулы β-КМЦД способны образовывать водородные связи между собой [56] и формировать сложные структуры [139]. С учётом известных литературных данных о порядке энергии димеризации, в том числе в системах с β-ЦД [208–210], энергию водородных связей между двумя молекулами β-КМЦД можно оценить как $\Delta G_{\text{НН}} \approx -7\ k_{\text{Б}} T$. При этом энергия

электростатического отталкивания между двумя частично экранированными β-КМЦД при эффективном заряде от –3 до –1 на расстоянии $r = \lambda_Д$ в приближении Дебая-Хюккеля:

$$E_{отт,стопка} \approx (0{,}33 – 3{,}00)\ k_Б T. \qquad (Б.7)$$

Тогда

$$\Delta G_{КМЦД\text{-}стопка} \approx –7 + (0{,}33 – 3{,}00) + 0{,}5 \approx (–6{,}2 \ldots –3{,}5) k_Б T. \qquad (Б.8)$$

При этом взаимодействие с молекулой β-КМЦД, адсорбированной на кластере ДОТАП, будет сопровождаться ещё большим энергетическим выигрышем в силу частичной экранировки заряда β-КМЦД. Так как площадь β-КМЦД $A_{β\text{-}КМЦД} \sim 2$ нм^2 больше площади липида ДОТАП $A_{ДОТАП}/A_{ДОФХ} \sim 0{,}7$ нм^2, то

$$\begin{gathered} \frac{\Delta G_{КМЦД\text{-}стопка}}{A_{β\text{-}КМЦД}} \ll \frac{\Delta G_{КМЦД\text{-}ДОФХ}}{A_{ДОФХ}} \\ \frac{\Delta G_{КМЦД\text{-}стопка}}{A_{β\text{-}КМЦД}} < \frac{\Delta G_{КМЦД\text{-}ДОТАП}}{A_{ДОТАП}}, \end{gathered} \qquad (Б.9)$$

что делает вероятность образования стопок больше, чем вероятность взаимодействия с единичной молекулой липида.

Энергетически добавление нового уровня можно представить как:

$$\Delta G_{рост}(m) \approx \Delta G_{Н\text{-}Н} + m E_{отт}^{слой} + \Delta G_{дегид,1}, \qquad (Б.10)$$

где m – число уже сформированных уровней, $E_{отт}^{слой}$ – энергия электростатического отталкивания свободной β-КМЦД от существующего уровня. Для частично экранированной β-КМЦД с эффективным зарядом –3 $E_{отт}^{слой} \approx 3{,}0\ k_Б T$, тогда

$$\Delta G_{рост}(m) \approx –7 + 3{,}0m + 0{,}5. \qquad (Б.11)$$

В результате, $\Delta G_{рост}(m = 2) \approx –0{,}5\ k_Б T$, тогда как при $m = 3$ значение составляет +2,5 $k_Б T$, поэтому при $n_{ур}^{пред} \approx 3$ присоединении четвёртого уровня становится энергетически невыгодным.

В АСМ-измерениях для ДОФХ/ДОТАП-монослоёв β-КМЦД-области выступают над монослоем примерно до 2 нм, тогда

$$n_{ур} \approx \frac{h_{АСМ}}{h_{КМЦД}} \approx \frac{2{,}0}{0{,}7} \approx 3. \qquad (Б.12)$$

В то же время на бислоях наблюдались КМЦД-ассоциаты высотой до 2,5–2,8 нм, что соответствует $n_{ур} \approx 3–4$ и совпадает с теоретической оценкой.

С учётом того, что гидродинамический диаметр комплекса сохраняется при концентрации $C_{β\text{-КМЦД}} = 1{,}25$ мг/мл β-КМЦД на $C_{лип} = 1$ мг/мл липосом [148,172], а также с учётом оценки средней молярной массы липида в смеси ДОТАП/ДОФХ $M_{лип} = 0{,}3M_{ДОТАП} + 0{,}7M_{ДОФХ}$ можно оценить число молекул β-КМЦД, приходящихся на одну молекулу ДОТАП в системе

$$N = \frac{[\text{β-КМЦД}]}{[\text{ ДОТАП}]} = \frac{C_{\text{β-КМЦД}} \cdot M_{лип}}{M_{\text{β-КМЦД}} \cdot 0{,}3 C_{лип}} \approx 2{,}5, \qquad (Б.13)$$

где $M_{β\text{-КМЦД}} = 1246$ г/моль, что соответствует порядку одной молекулы молекул β-КМЦД на одну молекулу липида в системе.

В результате, можно предположить, что при малых концентрациях β-КМЦД адсорбируется на мембрану преимущественно благодаря электростатическому взаимодействию с кластерами из катионных липидов ДОТАП. При увеличении концентрации β-КМЦД формирование липидных кластеров становится затруднено в силу ограниченного числа катионных липидов, и β-КМЦД формируют стопки из нескольких единиц на поверхности липосом. Таким образом, молекулы β-КМЦД, локализованные в электростатическом потенциале катионной мембраны липосомы, способны самоорганизоваться в сложные надмолекулярные структуры, формирование которых обусловлено особенностями их структуры и определяется балансом ионных взаимодействий и водородных связей. Предполагаемая схема образования стопок β-КМЦД на поверхности липидсодержащей системы представлена на рисунке Б.1.

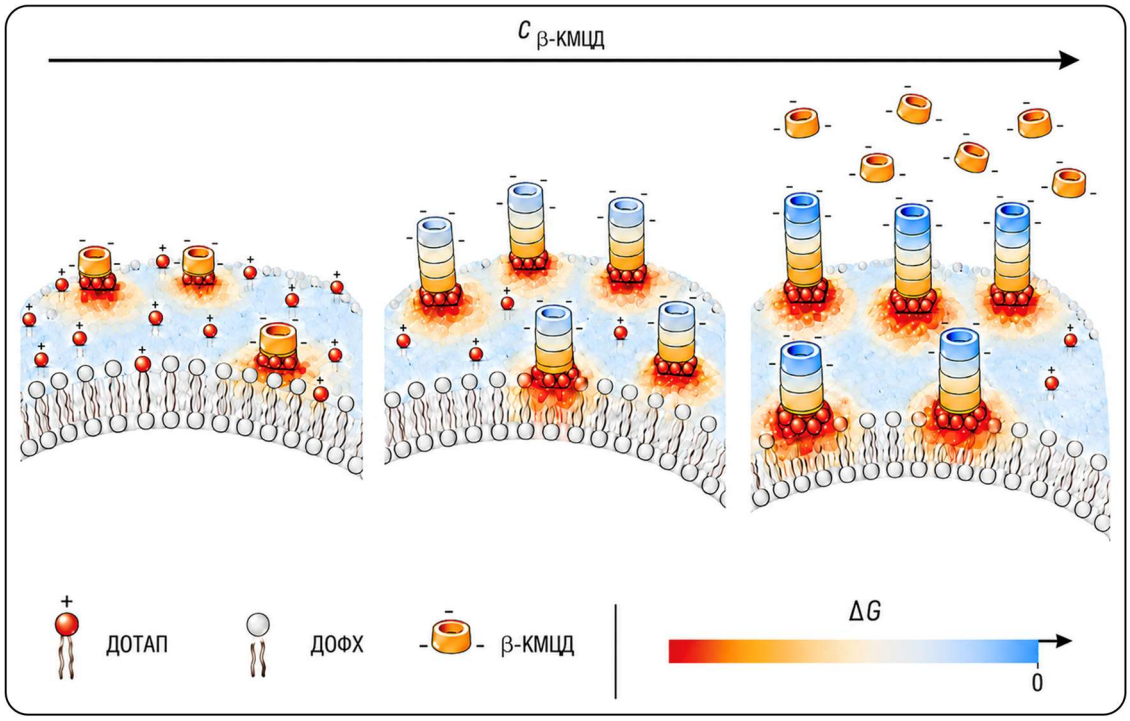


Рисунок Б.1 – Схема образования стопок β-КМЦД на поверхности липидсодержащей системы

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Оценки изменений энергий в процессах взаимодействий в системе МНЧ – планарная БЛМ

Аннотация: В данном приложении приведены оценки изменений энергий в процессах взаимодействий в системе «МНЧ – планарная БЛМ». Численные оценки энергии взаимодействия МНЧ радиусом $a = 2$ нм с липидной мембраной в соответствии с литературным обзором представлены при температуре $T = 298$ К и расстоянии между внешней поверхностью наночастицы и поверхностью полярных липидных головок мембраны $D = 0{,}6$ нм, соответствующего состоянию контакта наночастицы с мембраной на расстоянии толщины поверхностного слоя ТРИСH+.

Приведём оценки изменений энергий в процессах взаимодействий в системе «МНЧ – планарная БЛМ». Рассмотрим взаимодействие МНЧ и их агрегатов с мембраной в приближении сферической формы МНЧ. Взаимодействие между МНЧ и поверхностью мембраны может быть обусловлено преимущественно притяжением Ван-дер-Ваальса, координационным взаимодействием между поверхностными группами МНЧ и липидами мембраны, а также электростатическим взаимодействием между эффективным зарядом МНЧ и дипольными моментами липидов мембраны.

Энергия взаимодействия Ван-дер-Ваальса между индивидуальной МНЧ и поверхностью мембраны:

$$U_{\text{ВдВ}} = -\frac{Aa}{6D}, \qquad \text{(В.1)}$$

где $A \approx 10^{-21}$–10^{-20} Дж – константа Гамакера для комплекса магнетит-липид [211,212].

Для сопоставления данного вклада с другими удельными энергетическими членами полную энергию взаимодействия нормировали на площадь геометрической проекции МНЧ на мембрану $A_{\text{конт}} = \pi a^2$. Таким образом, удельная энергия взаимодействия Ван-дер-Ваальса в расчёте на площадь проекции имеет вид:

$$w_{\text{ВдВ}} = -\frac{U_{\text{ВдВ}}}{A_{\text{конт}}} = -\frac{Aa}{6D\pi a^2} \approx 0{,}01\text{–}0{,}1 \ \frac{k_{\text{Б}}T}{\text{нм}^2}. \qquad \text{(В.2)}$$

При увеличении размера агрегата возрастает площадь контакта и, следовательно, полная энергия взаимодействия коллоида с мембраной.

Оценим электростатическое взаимодействие индивидуальной МНЧ с планарной БЛМ. Азолектин представляет собой смесь природных фосфолипидов, ключевым компонентом которой является фосфатидилхолин. При физиологическом pH фосфатидилхолин является цвиттер-ионом с нулевым суммарным зарядом головки, однако в смеси могут присутствовать также и отрицательно заряженные, в том числе окисленные, липиды. В среде содержалось 5 мМ KCl и 5 мМ ТРИС-HCl, что соответствует ионной силе $I = 10$ мМ и радиусу Дебая $\lambda_{\text{Д}} \approx 3$ нм. Экспериментальная оценка ζ-потенциала липосом из азолектина позволяет предположить, что ζ-потенциал мембраны соответствует приблизительно $\zeta_{\text{м}} \approx -40$ мВ. При оценке $Q_{\text{эфф}} = 4\pi\varepsilon\varepsilon_0 a\zeta_{\text{нч}} \approx e$ в приближении экранированного поверхностного потенциала:

$$U_{\text{эл}}(D) = Q_{\text{эфф}}\zeta_{\text{м}} exp\left(-\frac{D}{\lambda_{\text{Д}}}\right), \ w_{\text{эл}} = -\frac{U_{\text{эл}}}{\pi a^2} \approx 0{,}1\,\frac{k_{\text{Б}}T}{\text{нм}^2}. \qquad \text{(В.3)}$$

Оценим энергию электростатического взаимодействия между МНЧ и дипольным моментом полярной головы липида. Полярная головка фосфатидилхолина является диполем, формируемым отрицательным зарядом на фосфате и положительным зарядом на четвертичной аммониевой группе холина. Расстояние между центрами зарядов согласно литературным данным [213,214] $d \sim 0{,}5$ нм, что соответствует дипольному моменту липида $p = ed \approx 8{,}0 \cdot 10^{-29}$ Кл·м. При площади, занимаемой одним липидом, $\sim 0{,}65$ нм^2 плотность головок составляет $\sim 1{,}5$ нм$^{-2}$ [215]. Возможность переориентации фосфохолиновых головок под действием заряженных МНЧ подтверждена экспериментально [95]. На основе вышеприведённых литературных данных удельную энергию электростатического взаимодействия МНЧ с диполем мембраны можно оценить как:

$$w_{\text{дип}} \approx -(0{,}02\text{–}0{,}10)\,{}^{kT}\!/_{\text{нм}^2}. \qquad \text{(В.4)}$$

Оценим вклад координационных взаимодействий между поверхностными группами МНЧ и головками липидов БЛМ. Поверхность МНЧ гидроксилирована и покрыта группами $FeOH$ и $Fe(OH)_2^+$, способными выступать активными центрами координации с липидами мембраны. При этом можно предположить, что координационное взаимодействие определяется преимущественно формированием контактов $Fe–O(P)$ между поверхностными атомами железа и атомами кислорода фосфатной группы липида [216]. Изменение свободной энергии при формировании одного такого адсорбционного контакта можно оценить как [217]

$$\varepsilon_{\text{коорд}} \approx (2{,}4–4{,}3)\ k_{\text{Б}}T. \qquad \text{(В.5)}$$

При этом для оценки важно учитывать структурные особенности организации липидов в мембране, переориентацию полярной части липида и конкуренцию за поверхностные группы Fe между молекулами ТРИСH^+ и липидами мембраны. В результате в непосредственном координационном взаимодействии может участвовать только часть полярных головок. В качестве модельной оценки примем долю участвующих липидов $f_{\text{коорд}} = 0{,}4–0{,}5$. Тогда эффективную поверхностную плотность координационных контактов можно оценить как:

$$\Gamma_{\text{эфф}} = \frac{f_{\text{коорд}}}{A_{\text{лип}}} \approx 0{,}6–0{,}75\ \text{нм}^{-2}. \qquad \text{(В.6)}$$

Так как координационные связи являются короткодействующими [218], то для их образования требуется сближение активных центров до расстояний порядка нескольких ангстрем с дегидратацией области контакта. При экспоненциальной зависимости гидратационного давления:

$$P_{\text{гидр}}(D) = P_0 \exp\left(-\frac{D}{\lambda_{\text{гидр}}}\right), \qquad \text{(В.7)}$$

удельная работа дегидратации определяется интегрированием расклинивающего давления по расстоянию между мембраной и частицей:

$$w_{\text{дегидр}}(D) = P_0 \lambda_{\text{гидр}} \exp\left(-\frac{D}{\lambda_{\text{гидр}}}\right). \qquad \text{(В.8)}$$

Используя параметры $P_0 = 3{,}9 \cdot 10^9$ дин/см^2 и $\lambda_{\text{гидр}} = 0{,}13$ нм из работы [219]:

$$w_{\text{дегидр}}(0{,}3\ \text{нм}) \approx 1{,}2\ \frac{k_{\text{Б}}T}{\text{нм}^2};$$
$$w_{\text{дегидр}}(0{,}4\ \text{нм}) \approx 0{,}57\ \frac{k_{\text{Б}}T}{\text{нм}^2}; \qquad \text{(В.9)}$$
$$w_{\text{дегидр}}(0{,}5\ \text{нм}) \approx 0{,}26\ \frac{k_{\text{Б}}T}{\text{нм}^2}.$$

Таким образом, гидратационный барьер частично компенсирует энергетический выигрыш от формирования координационных связей между поверхностью МНЧ и липидами мембраны. Введём удельную энергию адгезии, обусловленную координационными связями:

$$W_{\text{коорд}}^{\text{эфф}} = \Gamma_{\text{эфф}}\varepsilon_{\text{коорд}} - w_{\text{дегидр}}. \qquad \text{(В.10)}$$

С учётом вышеприведённых оценок в качестве рабочего интервала удельной энергии адгезии, обусловленной формированием координационных контактов *Fe*–*O*(*P*), будем использовать

$$W_{\text{коорд}}^{\text{эфф}} \approx 0{,}9\text{–}2{,}7\ \frac{k_{\text{Б}}T}{\text{нм}^2}. \qquad \text{(В.11)}$$

Можно ожидать динамического образования координационных связей и частичной десорбции молекул ТРИСH^+ с поверхности МНЧ при взаимодействии с липидной мембраной. С учётом того, что толщина оболочки из молекул ТРИСH+ на поверхности МНЧ значительно меньше радиуса Дебая, то влиянием стерического барьера при учёте электростатического потенциала и потенциала Ван-дер-Ваальсового взаимодействия можно пренебречь. Вкладом от формирования водородных связей между *–OH* группами МНЧ и атомами кислорода липидов также можно пренебречь.

Так как вся поверхность МНЧ обладает сродством к мембране, будем считать, что совокупная энергия адгезии МНЧ на мембране пропорциональна площади контакта $A_{\text{адг}}$. Вклады, обеспечивающие энергетический выигрыш от взаимодействия МНЧ с мембраной, будем определять положительные по модулю величины $w_{\text{i}} = -\Delta g_{\text{i}} > 0$. Тогда:

$$E_{\text{адг}} = -w_{\text{ад}}A_{\text{адг}},\ w_{\text{ад}} > 0, \qquad \text{(В.12)}$$

$$w_{\text{ад}} = w_{\text{ВдВ}} + w_{\text{эл}} + w_{\text{дип}} + w_{\text{коорд,эфф}} \approx 1{,}5\text{–}3{,}0\ k_{\text{Б}}T/\text{нм}^2. \qquad \text{(В.13)}$$

Полученный численный диапазон энергии «адгезии» согласуется с известными литературными данными по энергии взаимодействия МНЧ с мембранами [220]. В приближении сферической симметрии с радиусом R при полном оборачивании липидами мембраны агрегата площадь контакта будет равна площади поверхности агрегата $A_{адг} = 4\pi R^2$ и $E_{адг} = -4\pi w_{ад} R^2$.

Важно учесть, что взаимодействие МНЧ с липидной мембраной сопряжено с изменением кривизны мембраны. Согласно модели Хелфриха [221] энергия изгиба бислойной мембраны в приближении двумерной поверхности может быть вычислена как:

$$E_{изг} = \int \left[\frac{\kappa}{2} (2H - c_0)^2 + \bar{\kappa} K_G \right] \mathrm{d}A, \qquad \text{(В.14)}$$

где H – средняя кривизна поверхности; c_1 и c_2 – главные кривизны; $K_G = c_1 c_2$ – гауссова кривизна; c_0 – спонтанная кривизна, равная нулю для симметричного бислоя; κ – модуль изгиба ($\kappa \approx 10$–$20\ k_Б T$ [222]); $\bar{\kappa}$ – модуль гауссовой кривизны ($\bar{\kappa} \approx -0{,}8\kappa$ [223]). Для недеформированной мембраны $H = K_G = 0$ и $E_{изг} = 0$.

При полном оборачивании сферической наночастицы радиусом R в месте оборачивания мембрана принимает форму везикулы: $c_1 = c_2 = 1/R$, $H = 1/R$, $K = 1/R^2$, площадь $A = 4\pi R^2$. При оценке энергетических затрат на оборачивание МНЧ далее учитывается вклад, связанный со средней кривизной мембраны, который при $c_0 = 0$:

$$E_{изг,сф} = \int_0^{4\pi R^2} \left[\frac{k}{2} \left(\frac{2}{R} \right)^2 \right] dA = 8\pi k \qquad \text{(В.15)}$$

Гауссов вклад будет далее учтён при оценке энергии формирования перешейка. При рассмотрении процесса взаимодействия МНЧ с планарной БЛМ также необходимо учесть работу по изменению площади мембраны, которую совершает МНЧ при оборачивании липидом против поверхностного натяжения мембраны. Эту работу можно оценить как

$$E_{нат} \sim \sigma A(R), \qquad \text{(В.16)}$$

где σ – поверхностное натяжение мембраны, A – площадь искривлённой части мембраны. При полном оборачивании НЧ $A = 4\pi R^2$. Величина поверхностного натяжения σ может быть определена как:

$$\sigma(R) = \sigma_0 + K_A \frac{\Delta A_{мем}}{A_{рез}}, \quad (B.17)$$

где $\sigma_0 \sim 1–3$ мН/м – стандартное поверхностное натяжение [224], $K_A \frac{\Delta A_{мем}}{A_{рез}}$ – величина, учитывающая изменение поверхностного натяжения в результате ограниченности площади мембраны. Модуль сжатия $K \sim 250 \pm 50$ мН/м [225] и слабо зависит от типа липида, $A_{рез} \sim 0{,}5$ мм^2 – площадь БЛМ.

В настоящей работе мембрана, нанесённая по методу Мюллера, имела липидные торусы, выступающие в роли липидных резервуаров и содержащих практически неограниченный в масштабе системы запас липида в растворителе. Таким образом, можно предположить, что в исследуемой системе изменение площади мембраны не будет приводить к изменению поверхностного натяжения и не будет являться фактором, ограничивающим транслокацию ($K_A \frac{\Delta A_{мем}}{A_{рез}} \sim 0$).

Экспериментальные данные свидетельствуют о присутствии за мембраной агрегатов цепочечной структуры, состоящих из близких по форме и структуре звеньев размером порядка десятка нанометров. При этом присутствие несвязанных МНЧ у поверхности мембраны ограничено преимущественной локализацией агрегатов, имеющих больший совокупный магнитный момент, а также осмотическими эффектами. При этом анализ коллоидной стабильности МНЧ в цис-ячейке показал, что с мембраной могут взаимодействовать преимущественно цепочечные структуры, звеньями которых являются агрегаты МНЧ размером порядка десятков нанометров. Множественные литературные данные указывают на невозможность разветвленных агрегатов микронных размеров проходить через мембрану [223,226]. Известно, что взаимодействие с мембраной структур, имеющих существенную асимметричность вдоль одной оси, затруднено в связи с колоссальными энергиями, необходимыми для изгиба мембраны [227]. Энергия

изгиба мембраны при полном обёртывании сферической частицы, описываемая с помощью модели Хелфриха, не зависит от радиуса коллоида, а значит не учитывает «фактор формы». При взаимодействии агрегата цепочечной формы с мембраной необходимо совершить работу по деформации мембраны под цилиндрическую форму коллоида:

$$c_1 = \frac{1}{r} = 2H,\ c_2 = 0,\ K_G = 0. \tag{В.18}$$

Тогда энергия изгиба цилиндрической части мембраны равна:

$$E_{\text{изг,цил}} = \frac{\kappa}{2}\frac{1}{r^2}\cdot 2\pi rL = \frac{\kappa\pi L}{r}, \tag{В.19}$$

где $2\pi rL$ – площадь боковой поверхности цилиндра радиусом r и длиной L.

Для цепочечной структуры из m звеньев $L \approx 2r(m-1)$, поэтому:

$$E_{\text{изг,цил}} \approx 2\pi\kappa(m-1). \tag{В.20}$$

Учтём непрерывность изменения энергии мембраны, используя гладкую функцию перехода $s(m)$:

$$s(m) = \frac{1}{1 + exp\left(-\frac{m - m_{\text{кр}}}{\Delta}\right)}, \tag{В.21}$$

где $m_{\text{кр}}$ – критическое число звеньев, при котором необходимо учитывать анизотропность структуры; Δ – ширина перехода, обеспечивающая непрерывность изменения потенциала.

Ранее было показано, что для агрегатов МНЧ во внешнем магнитном поле начало анизотропной агрегации характерно при достижении $N_0 \approx 20$–30 МНЧ в кластере. В качестве оценки будем использовать $N_0 = 30$. Тогда $m = N/N_0$, где N – общее число МНЧ в агрегате. Оценим $m_{\text{кр}}$, при котором энергии изгиба сферы $E_{\text{изг,сф}}$ и цилиндра $E_{\text{изг,цил}}$ станут одного порядка, как:

$$\left.\begin{aligned} E_{\text{изг,сф}} &= 8\pi k \\ E_{\text{изг,цил}} &= k\pi\frac{L}{r} \approx 2\pi k(m-1) \end{aligned}\right\} \Rightarrow 2\pi k(m-1) \sim 8\pi k \Rightarrow m_c \sim 5 \tag{В.22}$$

Таким образом, при $m_{\text{кр}} \approx 5$ цилиндрический вклад становится сравнимым с энергией оборачивания сферы, а при $m > m_{\text{кр}}$ энергетические затраты на оборачивание значительно возрастают. Оценим Δ, исходя из соображений,

что переход «сфера → цепочка» происходит при $m \in [m_{кр}, m_{кр} + \Delta]$. Если разброс составляет порядка двух звеньев, тогда $\Delta \sim 0{,}5–1{,}0$. В качестве оценки будем использовать $\Delta = 0{,}6$ для обеспечения «размывания» перехода.

Таким образом,

$$E_{формы} = 2\pi k(m-1)s(m). \quad \text{(В.23)}$$

Так как энергетический барьер по изменению кривизны мембраны ограничивает прохождение через мембрану индивидуальных МНЧ путём оборачивания, то будем рассматривать прохождение для агрегатов N МНЧ, для которых характерно цепочечное агрегатообразование при $N > N_0$. Их эффективный размер будем оценивать радиусом сферы, эквивалентной агрегату по объёму: $R = a\left(\frac{N}{\varphi}\right)^{1/3}$. При этом будем считать удельную энергию адгезии агрегатов равной удельной энергии адгезии индивидуальных МНЧ.

Важно отметить, что полное оборачивание МНЧ липидами мембраны является необходимым, но недостаточным условием прохождения через мембрану. При оборачивании коллоида формируется липидный перешеек, соединяющий комплекс частицы с липидом и мембрану [226,228]. Согласно литературным данным, перешеек имеет седловидную форму [229], для которого в соответствии с моделью Хелфриха:

$$c_1 = \frac{1}{R_1} > 0,\ c_2 = -\frac{1}{R_2} < 0,\ |R_1| \approx |R_2|; \quad \text{(В.24)}$$

$$K_G = c_1 c_2 < 0,\ H = \frac{1}{2}(c_1 + c_2). \quad \text{(В.25)}$$

Площадь перешейка соответствует площади боковой поверхности цилиндра длиной $L_{пер}$ и радиусом $r_{пер}$ и составляет $A_{пер} = 2\pi r_{пер} L_{пер}$. Длина перешейка $L_{пер} \approx 5$ нм соответствует толщине БЛМ. Согласно литературным данным, характерный радиус перешейка составляет 2–3 нм [228,230]. Известно, что в клетках оборачивание коллоидных МНЧ может осуществляться благодаря работе специальных белковых конструкций, а процесс отделения везикулы от мембраны происходит самопроизвольно при достижении радиуса перешейка $r_{пер} \sim 2{,}7–2{,}8$ нм [228].

Тогда

$$E_{\text{пер}} = \int \bar{k} K dA = \bar{k} K \cdot A = 2\pi \left|\bar{k}\right| \frac{L_{\text{пер}}}{r_{\text{пер}}}. \quad \text{(В.26)}$$

Также необходимо учесть изменение свойств мембраны при приложении трансмембранного потенциала 50 мВ, имитирующего характерный трансмембранный потенциал живых систем. Запасённая в электрическом поле энергия мембраны:

$$E_{\text{ёмк}} = \frac{1}{2} C_{\text{м}} (\Delta V)^2 A, \quad \text{(В.27)}$$

где $C_{\text{м}} \approx 1$ мкФ/см² – удельная ёмкость мембраны [231], A – площадь мембраны. При оборачивании МНЧ возникает дополнительное поверхностное натяжение:

$$\sigma_{\text{эл}} = \frac{1}{2} C_{\text{м}} (\Delta V)^2 \approx 0{,}0125 \frac{\text{мН}}{\text{м}}. \quad \text{(В.28)}$$

Тогда полное поверхностное натяжение составляет $\sigma = \sigma_0 + \sigma_{\text{эл}} \approx 2{,}0125$ мН/м. Поскольку $\sigma_{\text{эл}}/\sigma_0 < 1$ %, то электрострикционный вклад лишь незначительно увеличивает общее натяжение мембраны.

С учётом вышеперечисленных вкладов на рисунке В.1 получена зависимость нормированной на $k_{\text{Б}}T$ энергии «прохождения» от радиуса равновеликой сферы:

$$\frac{\Delta G_{\text{прох}}(R)}{k_{\text{Б}}T} = \frac{-4\pi w_{\text{ад}} R^2 + 8\pi\kappa + 4\pi R^2(\sigma_0 + \sigma_{\text{эл}}) + 2\pi\kappa[m(R) - 1]s[m(R)] + 2\pi k \frac{L_{\text{пер}}}{r_{\text{пер}}}}{k_{\text{Б}}T}. \quad \text{(В.29)}$$

В расчёте использованы $\kappa = 15\ k_{\text{Б}}T$, $\sigma_0 = 2$ мН/м, $\Delta = 0{,}6$, $m_{\text{кр}} = 5$, $a = 2$ нм, $N_0 = 30$, $\varphi = 0{,}64$, $L_{\text{пер}} = 5$ нм и $r_{\text{пер}} = 2{,}8$ нм. При численной подстановке $w_{\text{ад}}$ и σ выражены в $k_{\text{Б}}T$/нм², а κ и $\bar{k}$ – в $k_{\text{Б}}T$. Значения $w_{\text{ад}}$ 1,5, 2 и 3 $k_{\text{Б}}T$/нм² рассматриваются как три модельных сценария в пределах оценённого диапазона.

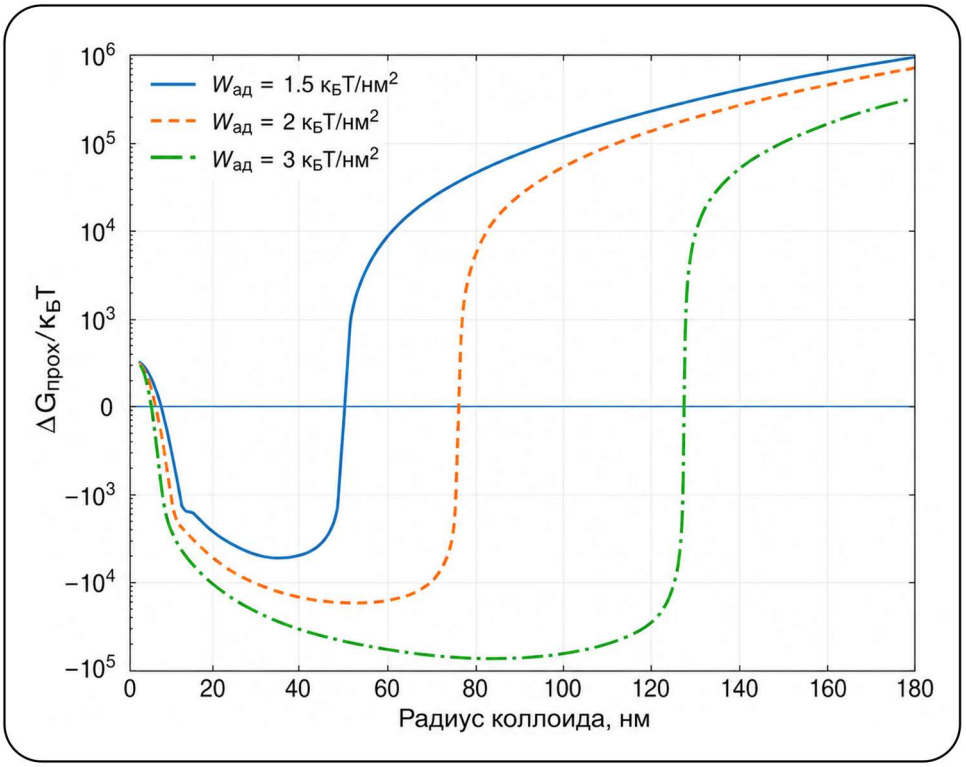


Рисунок В.1 – Зависимость нормированной энергии прохождения МНЧ сквозь мембрану от радиуса равновеликой сферы при к = 15 $k_Б T$, σ₀ = 2 мН/м и Δ = 0,6

Анализ $\Delta G_{прох}(R)/k_Б T$ выявляет существенную зависимость энергетического баланса системы от удельной энергии адгезии МНЧ к поверхности БЛМ, существование нижней и верхней границ размеров агрегатов, для которых конечное состояние после оборачивания и формирования перешейка оказывается термодинамически выгодным, а также размер агрегатов, для которых прохождение через мембрану оказывается наиболее энергетически выгодным. При $w_{ад}$ = 1,5 $k_Б T$/нм^2 область отрицательной свободной энергии соответствует радиусам агрегатов от 6 до 50 нм, а энергетический минимум достигается для $R_{опт} \approx$ 34 нм. При $w_{ад}$ = 2 $k_Б T$/нм^2 энергетически выгодная область составляет приблизительно 5–75 нм при $R_{опт} \approx$ 50 нм. При $w_{ад}$ = 3 $k_Б T$/нм^2 отрицательная область расширяется приблизительно до 4–125 нм, а энергетический минимум достигается при $R_{опт} \approx$ 84 нм. Для оценки чувствительности модели расчёт был дополнительно проведён при к равным 10, 15 и 20 $k_Б T$ и σ₀ равным 1, 2 и 3 мН/м. При $w_{ад}$ = 1,5 $k_Б T$/нм^2 оптимальный радиус изменяется в пределах 19–63 нм, при $w_{ад}$ = 2 $k_Б T$/нм^2 – в пределах 33–88 нм, а при $w_{ад}$ = 3 $k_Б T$/нм^2 – в пределах 57–138 нм. Средние значения по перебранной сетке параметров составляют

соответственно (36,5 ± 13,7) нм; (54,6 ± 18,4) нм и (90,7 ± 28,8) нм. Приведённый разброс характеризует чувствительность рассчитанного оптимума к выбору модуля изгиба и поверхностного натяжения мембраны. Для агрегатов размером меньше нижней пороговой величины полное оборачивание в рамках рассматриваемого приближения оказывается термодинамически невыгодным. Ключевым фактором, ограничивающим прохождение МНЧ, является необходимость формирования липидного перешейка: для малого коллоида его радиус может быть сопоставим с радиусом самого агрегата, что требует более существенной деформации мембраны [228]. При достаточно большой удельной энергии адгезии можно предположить существование кооперативного механизма, при котором в области контакта с мембраной наблюдается агрегация МНЧ до достижения размеров агрегата, при которых его прохождение оказывается энергетически выгодным[121]. В то же время для более крупных агрегатов оборачивание липидным слоем и формирование перешейка критического размера оказывается энергетически выгодно и может обуславливать их последующее отделение от мембраны. Учёт фактора формы создаёт верхнюю размерную границу, поскольку при росте числа частиц в агрегате возрастает вклад $E_{\text{формы}} \propto R^3$, связанный с цилиндрическим искривлением мембраны вокруг цепочечной структуры. В результате прохождение разветвлённых агрегатов микронного размера через БЛМ оказывается энергетически невыгодным. При этом важно отметить, что отрицательное значение итоговой $\Delta G_{\text{прох}}$ означает термодинамическую выгодность конечного состояния в рамках модели, но не доказывает отсутствие промежуточного кинетического барьера по степени оборачивания или при отделении перешейка.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Оценки состояния железосодержащих МНЧ в эксперименте по изучению взаимодействия МНЧ с модельной планарной БЛМ

Аннотация. В приложении приведены оценки состояния МНЧ в эксперименте по изучению взаимодействия МНЧ с планарной БЛМ. Характеризована коллоидная стабильность суспензии, а также приведены оценки энергий извлечения МНЧ из агрегатов МНЧ.

Приведём оценки состояния МНЧ после добавления в цис-ячейку кюветы. В соответствии с теорией ДЛВО [232,233] потенциал взаимодействия МНЧ определяется, в первую очередь, балансом Ван-дер-Ваальсового притяжения и электростатического отталкивания. С учётом также магнитного диполь-дипольного взаимодействия и стерического взаимодействия, обусловленного присутствием молекул ТРИС на поверхности МНЧ, оценка энергий взаимодействия МНЧ показывает, что на границе слоя ТРИСH^+ на поверхности МНЧ формируется потенциальная яма порядка kT, определяющая агрегацию индивидуальных МНЧ. Оценим время агрегации МНЧ после добавления в цис-ячейку кюветы. Для монодисперсных сферических частиц в рамках теории Смолуховского константа скорости быстрой коагуляции в предположении, что каждое столкновение частиц, обусловленное броуновским движением, приводит к коагуляции, может быть рассчитана как [234,235]:

$$k_{\text{fast}} = \frac{2kT}{3\eta}\left(\frac{1}{a_1}+\frac{1}{a_2}\right)(a_1+a_2) = \frac{8kT}{3\eta} \approx 1\times10^{-17}\ \frac{\text{м}^3}{\text{с}}, \qquad (\text{Г}.1)$$

при $a_1 = a_2 = a$, где a_1 и a_2 – радиусы взаимодействующих МНЧ, $k_\text{Б}$ – постоянная Больцмана, T – температура, η – вязкость жидкой фазы. Время половинной коагуляции, при котором численная концентрация МНЧ $\widetilde{N}(t)$ уменьшается от начальной концентрации МНЧ после их добавления в цис-ячейку $\widetilde{N}_0$ до $\widetilde{N}_0/2$ составляет:

$$t_{1/2}^{\text{fast}} = \frac{2}{k_{\text{fast}}\widetilde{N}_0} \approx 7 \text{ мс} \qquad (Г.2)$$

Так как на начальных стадиях агрегации не существует ориентации МНЧ, обеспечивающей минимум энергии взаимодействия, а потенциальный барьер, ограничивающий столкновение МНЧ, незначителен, в системе следует ожидать формирования рыхлых изотропных фрактальных агрегатов МНЧ в соответствии с теорией диффузионно-ограниченной кластерной агрегации [236]. При увеличении числа МНЧ в агрегате вследствие диполь-дипольных взаимодействий возрастает число коррелированных магнитных моментов [237]. При этом кластеры из сотен МНЧ имеют размеры порядка десятков нанометров и ведут себя как частицы с единым магнитным моментом $M \approx Nm$, где N – число МНЧ в кластере, а m – магнитный момент МНЧ:

$$m = M_{\text{s}} \cdot \frac{4\pi a^3}{3} \approx 1{,}61 \times 10^{-20} \text{ А}\cdot\text{м}^2, \qquad (Г.3)$$

где $M_{\text{s}} = 4{,}8 \times 10^5$ А/м – намагниченность насыщения магнетита [238]. При увеличении размера агрегатов магнитное диполь-дипольное взаимодействие начинает преобладать по сравнению с остальными энергетическими вкладами. Необходимо учесть, что в рассматриваемой экспериментальной системе присутствует постоянное неоднородное стационарное магнитное поле, обеспечивающее локализацию МНЧ у поверхности мембраны. Ориентация дипольных моментов МНЧ во внешнем магнитном поле изменяет характер их агрегации. Критическое число МНЧ N_0 в агрегате, при котором магнитный момент кластера из N МНЧ ориентируется вдоль поля, может быть определено из условия равенства энергии теплового движения и магнитостатической энергии взаимодействия магнитного момента с внешним полем [239]:

$$\xi_{\text{N}} = \frac{NmB}{kT} \sim 1 \quad \Rightarrow \quad N_0 \approx \frac{kT}{mB} \approx 26 \quad \text{при} \quad B = 10 \text{ мТл.} \qquad (Г.4)$$

При $N > N_0$ кластеры начинают вести себя как коллоиды с единым магнитным моментом, ориентированным вдоль поля. Ориентация агрегатов создаёт анизотропность столкновений, что приводит к уменьшению их

разветвлённости и формированию квазицепочечных структур, состоящих из «звеньев» – агрегатов МНЧ [240]. Эффективный размер «звена» зададим радиусом сферы с объёмом, эквивалентным объёму агрегата:

$$R_{\text{зв}} = a\left(\frac{N_0}{\varphi}\right)^{1/3} \approx 7 \text{ нм} \qquad (\Gamma.5)$$

где для случайной плотной упаковки $\varphi \approx 0{,}64$ [241]. При этом размер звена может увеличиваться вследствие дополнительной агрегации МНЧ. Ключевой же ролью внешнего магнитного поля в системе является обеспечение локализации МНЧ у поверхности мембраны. В градиенте внешнего магнитного поля ∇B на МНЧ или агрегат МНЧ действует сила $F \approx \langle m \rangle \nabla B$. Так как при сонаправленной ориентации магнитных моментов составляющих кластер МНЧ его суммарный магнитный момент можно считать пропорциональным числу МНЧ в кластере [237,242], на временных масштабах эксперимента в непосредственной близости от поверхности мембраны можно ожидать преимущественной локализации крупных агрегатов – цепочечных структур, имеющих больший совокупный магнитный момент. Адсорбированные на мембране МНЧ могут выступать в качестве центров агрегатообразования частиц МНЧ, сконцентрированных в приповерхностном слое мембраны (рис. Г.1). В связи с этим уменьшается вероятность присутствия у поверхности мембраны свободных несвязанных МНЧ и малых агрегатов.

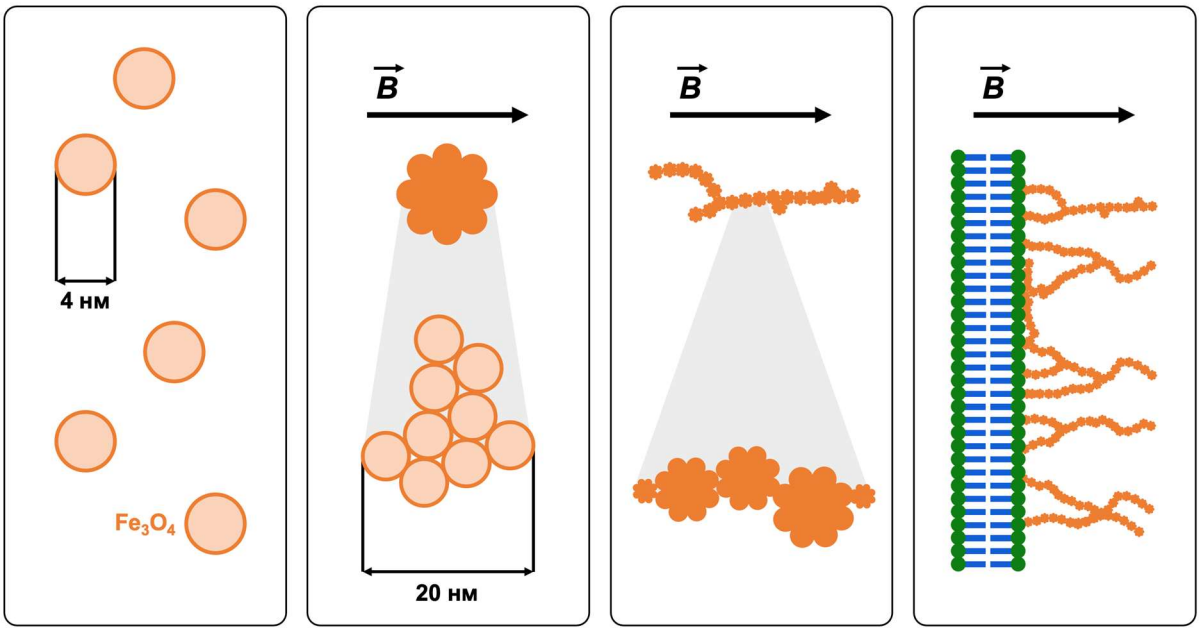


Рисунок Г.1 – Предполагаемая схема агрегатообразования железосодержащих МНЧ во внешнем магнитном поле

Таким образом, можно предположить, что во взаимодействие с мембраной вступают преимущественно квази-цепочечные структуры, звеньями которых являются агрегаты МНЧ, имеющие размеры порядка десятков нанометров. Примечательно, что работа по извлечению звена квазицепочечной структуры у поверхности мембраны может быть сопоставима с энергией последовательного отрыва нескольких индивидуальных МНЧ от звена. Энергия извлечения индивидуальной МНЧ из агрегата с числом контактов $z_{\text{eff}} \approx 3$–5, расположенной на поверхности звена-агрегата МНЧ составляет порядка:

$$W_{\text{изв}}^{(1)} \approx z_{\text{eff}} W_{\text{pair}} \approx 3\text{–}5\, k_{\text{Б}} T. \qquad (\text{Г}.6)$$

В то же время энергию отрыва звена от цепочки можно оценить как работу против энергии взаимодействия двух соседних агрегатов – магнитных диполей с моментами $M \approx Nm$, ориентированными внешним магнитным полем вдоль оси цепочки. При такой ориентации энергия магнитного диполь-дипольного притяжения соседних звеньев при непосредственном контакте компактных агрегатов $r \approx 2R_{\text{зв.}}$

$$U_{\text{маг}} = -\frac{\mu_0}{2\pi}\frac{M^2}{r^3} = -\frac{\mu_0}{2\pi}\frac{N^2 m^2}{r^3} \approx -(2{,}5\text{–}3{,}8) k_{\text{Б}} T, \qquad (\text{Г}.7)$$

Для звена, расположенного внутри цепочки и связанного с двумя соседними агрегатами, работа отрыва может оказаться больше. Ключевым является то, что работа по извлечению звена цепочечной структуры сопоставима с энергией последовательного отрыва нескольких индивидуальных МНЧ от агрегата. Наблюдаемые размеры агрегатов МНЧ и липидов на магнитной ловушке в транс-ячейке экспериментальной установки могут объясняться преимущественным прохождением через БЛМ звеньев квазицепочечных структур и комплексов из нескольких звеньев. Приведённые величины являются оценкой порядка размера агрегата, поскольку они существенно зависят от числа МНЧ в звене, расстояния между соседними звеньями и степени взаимного упорядочения их магнитных моментов. При этом прохождение мембраны агрегатами МНЧ, размеры которых превышают толщину БЛМ, естественным образом изменяет конфигурацию распределения электрических полей внутри мембраны, которая будет зависеть от структуры и соотношения размеров проникающих элементов и мембраны и отличаться от приведённых выше оценок.