



## РЕГУЛЯЦИЯ СВОЙСТВ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С 2-ГИДРОКСИПРОПИЛ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТАЛИ

© 2020 г. А. А. Скуредина\*, #, А. С. Тычинина\*,  
И. М. Ле-Дейген\*, Н. Г. Белогорова\*, Е. В. Кудряшова\*

\*ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

Поступила в редакцию 04.04.2020 г.

После доработки 15.04.2020 г.

Принята к публикации 18.04.2020 г.

Работа посвящена исследованию механизма взаимодействия 2-гидроксипропил β-циклодекстрина (ГПЦД) с липосомальным бислоем. Методом ИК-спектроскопии Фурье установлено, что основным сайтом связывания ГПЦД на поверхности нейтральных липосом на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) являются фосфатные группы липидов. Комплексообразование с ГПЦД приводит к стабилизации гелеобразного состояния в монокомпонентных липосомах (ДПФХ). Включение анионного компонента – кардиолипина (КЛ, 20%) в бислою приводит к изменению механизма взаимодействия липосомы-ГПЦД: наблюдается разупорядочение липидов в бислое, приводящее к нарушению целостности мембраны, что проявляется в высвобождении красителя (фенолфталеина), загруженного в липосомы. Влияние ГПЦД на процесс и параметры фазового перехода анионных липосом исследовали по термограммам, полученным на основе изменения положения полос поглощения ацильных цепей липидов в ИК-спектре липосом. Обнаружено расслоение ДПФХ/КЛ (80/20%) бислоя на две микрофазы с различным содержанием кардиолипина. Установлено, что ГПЦД обуславливает более выраженное расслоение в бислое: наблюдается дестабилизация мембраны вблизи температуры плавления микрофазы, обогащенной КЛ и наоборот – снижение подвижности липидов в областях с низким содержанием КЛ. При исследовании влияния ГПЦД на взаимодействие антибактериального препарата – левофлоксацина (ЛВ) с липидным бислоем обнаружено, что комплексообразование лекарственных молекул с ГПЦД приводит к увеличению эффективности адсорбции лекарственной молекулы на поверхности бислоя и может обеспечить облегчение транспорта лекарства за счет образования дефектов в мембране, при этом ЛВ в комплексе с ГПЦД демонстрирует высокую антибактериальную активность в системах *in vitro*, не ниже по сравнению со свободным ЛВ.

*Ключевые слова:* циклодекстрины, липосомы, ИК-спектроскопия, КД спектроскопия, фазовый переход, антибактериальная активность

DOI: 10.31857/S0132342320050243

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных направлений развития биоорганической и биомедицинской химии на сегодняшний день является разработка новых высокоэффективных лекарственных формуляций с использованием различных систем доставки. Включение лекарства в системы доставки позволяет увеличить растворимость препарата и его биодоступность, снизить вероятность возникновения

побочных эффектов, а также придать формуляции новые свойства: адресная доставка, замедленное высвобождение или высвобождение под действием внешнего фактора (температуры, изменения pH, облучения света и т.д.), влияние на проницаемость биомембран для лекарственной субстанции.

На сегодняшний день одним из перспективных видов носителей лекарств являются циклодекстрины (ЦД) – циклические олигосахариды, образованные несколькими D-глюкопиранозными остатками [1]. ЦД имеют форму усеченного конуса с внешней гидрофильной поверхностью и внутренней гидрофобной полостью. Такое строение ЦД обуславливает их способность формировать комплексы включения типа “гость-хозяин”

Список сокращений: ГПЦД, 2-гидроксипропил β-циклодекстрин; ДПФХ дипальмитоилфосфатидилхолин; КЛ, кардиолипин; ЛВ, левофлоксацин; МИК, минимальная ингибирующая концентрация; ФФ фенолфталеин; ЦД, циклодекстрин.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 939-34-34; эл. почта: skuredinanna@gmail.com).

со многими гидрофобными веществами, в том числе и с лекарственными молекулами. Включение в полость ЦД способствует увеличению растворимости и стабильности гидрофобной молекулы, устранению неприятных запахов и вкусов, а также обеспечению защиты от деградации микроорганизмами [2–4].

В зависимости от размера лекарственной молекулы возможно использование одного из трех типов ЦД ( $\alpha$ -ЦД,  $\beta$ -ЦД или  $\gamma$ -ЦД), различающихся количеством D-глюкопиранозных остатков и, следовательно, размером внутренней полости. Большинство лекарственных молекул имеют в своей структуре небольшие гидрофобные ароматические фрагменты (например, фторхинолоны, ибупрофен, хлорамфеникол и др.), поэтому наиболее часто используются производные на основе  $\beta$ -ЦД [5]. Введение заместителей изменяет физико-химические свойства самого  $\beta$ -ЦД, значительно повышая его растворимость, а также влияет на стабильность его комплексов, поскольку новая функциональная группа может образовывать дополнительные связи с молекулой “гостя” [6–8].

Среди всех производных  $\beta$ -ЦД наиболее широкое применение в медицине имеет 2-гидроксипропил  $\beta$ -ЦД (ГПЦД). ГПЦД обладает высокой растворимостью в воде (больше 600 мг/мл), способен образовывать стабильные комплексы включения с широким спектром лекарственных препаратов. Безопасность ГПЦД была доказана *in vivo*, на сегодняшний день на фармацевтическом рынке существует несколько лекарственных формулаций на основе комплексов ГПЦД [2, 4].

Широкое применение ЦД в фармацевтике обуславливает необходимость глубокого изучения их способности взаимодействовать с биологическими мембранами. Известно, что в ряде случаев встраивание различных полимерных макромолекул в липидный бислои или их адсорбция на поверхности могут вызывать существенные изменения свойств биологической мембраны: ее проницаемости, микровязкости, скорости диффузии латеральной липидных молекул и скорости “флип-флопа”. Эти явления могут приводить к значительным изменениям в состоянии и жизнедеятельности клетки, вызывая активацию или ингибирование ферментов, влияя на клеточный гомеостаз, влияя на трембогенность липидной мембраны [9, 10].

ЦД не способны проникать сквозь биологические барьеры, однако их производные могут сорбироваться на клеточной мембране и в ряде случаев извлекать из бислоя липиды, в том числе, холестерин, что приводит к нарушению целостности мембраны [1, 11]. Однако в целом эффект на физико-химические свойства мембраны чаще всего является мягким и обратимым. Возникновение дефектов в бислое под действием ЦД приводит к улучшению проникновения лекарственных пре-

паратов сквозь мембрану и увеличивает их биодоступность [12].

В настоящее время механизм взаимодействия производных ЦД с липидами в бислое, как и влияние комплексообразования ЦД с лекарственными молекулами на проницаемость биомембран для этих лекарственных субстанций, недостаточно изучен. Определение эффективности связывания и основных сайтов взаимодействия липосом с ЦД необходимо для разработок высокоэффективных систем доставки лекарственных препаратов на основе ЦД с улучшенной биодоступностью. Для установления механизма взаимодействия производных ЦД с липидным бислоем в работе рассмотрено влияние ГПЦД на состояние и целостность липосом различного состава спектроскопическими методами, главным образом, с помощью метода ИК-спектроскопии Фурье. Методом КД спектроскопии изучено влияние ГПЦД на механизм взаимодействия лекарственной субстанции – левофлоксацина (ЛВ) с липосомами, что крайне важно при разработке систем доставки лекарств с использованием производных ЦД.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для детального исследования механизма взаимодействия ГПЦД нейтральными (100% ДПФХ) и анионными (ДПФХ/КЛ = 80/20%) липосомами, а также для установления основных сайтов связывания в комплексе липосома-ГПЦД, был применен метод ИК спектроскопии Фурье. ИК спектроскопия является высокоинформативным методом исследования состояния бислоя, поскольку позволяет следить за изменениями состояния каждой функциональной группы липидов и их лигандов, и предоставляет ценную информацию об физико-химических свойствах мембраны, например, о подвижности гидрофобных цепей [14, 15].

### *Исследование систем липосома-ГПЦД методом ИК спектроскопии Фурье*

В ИК-спектре как монокомпонентных нейтральных (100% ДПФХ, рис. 1а), так и двухкомпонентных анионных (ДПФХ/КЛ = 80/20%) липосом присутствуют высокоинтенсивные полосы поглощения 2919 и 2851  $\text{см}^{-1}$ , соответствующие асимметричным и симметричным валентным колебаниям  $\text{C-H}_2$  групп гидрофобных цепей липидов. Полосы поглощения 1727–1740 и 1220–1230  $\text{см}^{-1}$  характерны для колебаний  $\text{C=O}$  и асимметричных валентных колебаний фосфатных групп соответственно [13].

В ИК-спектре ГПЦД (рис. 1б) наиболее интенсивная полоса поглощения при 1032  $\text{см}^{-1}$  соответствует колебаниям  $\text{C-O-C}$  связи. Кроме того, аналитически значимыми могут быть полосы

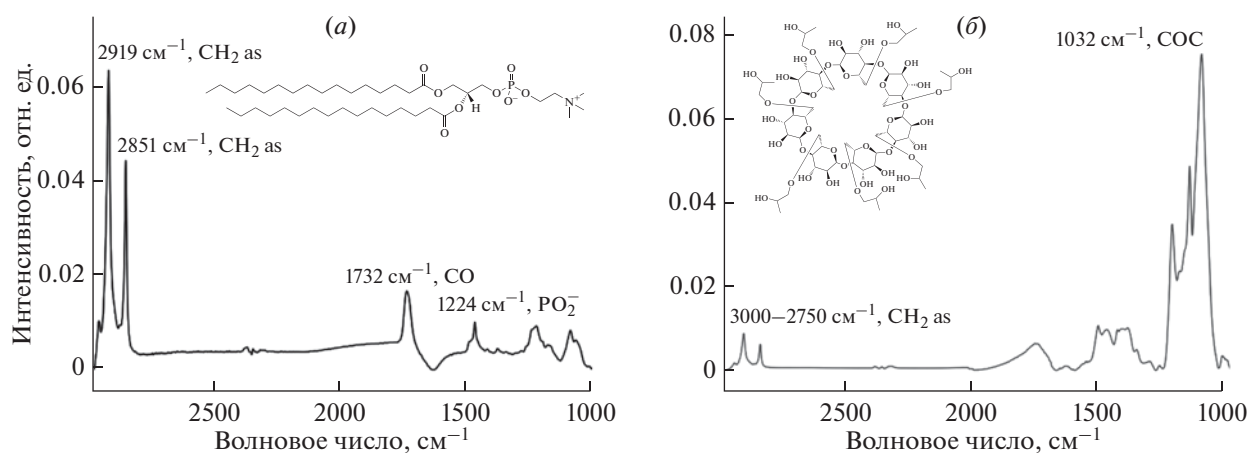


Рис. 1. (а) ИК-спектр липосом из дипальмитоилфосфатидилхолина,  $C_{\text{липидов}} = 5$  мг/мл, pH 7.4. (б) ИК-спектр 2-гидроксипропил  $\beta$ -циклодекстрина,  $C_{\text{ГПЦД}} = 50$  мг/мл, pH 7.4.

поглощения в диапазоне  $3000\text{--}2750\text{ см}^{-1}$ , соответствующие колебаниям  $\text{CH}_3$  и  $\text{CH}_2$  группам. Следует отметить, что наиболее интенсивные полосы поглощения липосом находятся в области больших волновых чисел, в то время как для ГПЦД — в области малых, что делает ИК-спектроскопию более привлекательным методом для анализа систем, содержащих оба компонента, с точки зрения исключения перекрывания полос. В настоящей работе для исследования состояния бислоя в присутствии ГПЦД из ИК-спектра системы липосомы-ГПЦД вычитался ИК-спектр ГПЦД и были определены положения основных полос поглощения липидов.

Для получения комплексов липосомы-ГПЦД к суспензии липосом (5 мг/мл) добавляли ГПЦД в диапазоне значений концентрации от 20 до 60 мг/мл. Для того чтобы определить роль фазового состояния липидной мембраны на механизм взаимодействия липидного бислоя с ГПЦД варьировали температуру предварительной инкубации комплексов (25, 37 или  $50^\circ\text{C}$ ): при  $25^\circ\text{C}$  липосомы (100% ДПФХ и 80/20% ДПФХ/КЛ) находятся в гелеобразном состоянии, вблизи  $37^\circ\text{C}$  — в состоянии фазового перехода, а при  $50^\circ\text{C}$  как анионные, так и нейтральные липосомы находятся в жидкокристаллическом состоянии [13]. После инкубации комплексы охлаждали до комнатной температуры и регистрировали ИК-спектры. В табл. 1 приведены положения полос ИК-спектров комплексов нейтральных липосом (100% ДПФХ) с ГПЦД при различных условиях инкубации. Важно отметить, что сдвиг полосы поглощения в ИК-спектре более, чем на  $1\text{ см}^{-1}$  является аналитически значимым [14, 16].

Согласно полученным данным, при температуре инкубации  $25^\circ\text{C}$  с ГПЦД положения полос поглощения в ИК-спектрах липосом (100% ДПФХ)

существенным образом не изменяются вне зависимости от концентрации циклодекстрина. Вероятно, это свидетельствует об отсутствии или незначительности взаимодействия между ГПЦД с мембраной в гелеобразном состоянии, характеризующимся ограниченной подвижностью гидрофобных цепей в бислое.

Иная картина наблюдается при предварительной инкубации с нагревом. Установлено, что наиболее выраженные сдвиги полос поглощения в ИК-спектре липосом наблюдаются при температуре предварительной инкубации  $50^\circ\text{C}$  и наиболее высокой концентрации ГПЦД — 60 мг/мл (рис. 2). Липосомы при данной температуре находятся в жидкокристаллическом состоянии и обладают высокой подвижностью ацильных цепей в бислое.

Согласно табл. 1 в данных условиях наиболее выраженные изменения наблюдаются для полосы поглощения асимметричных валентных фосфатной группы: существенный высокочастотный сдвиг указывает на снижение степени гидратации данных функциональных групп, по-видимому, за счет образования водородных связей со стерически наиболее доступными гидроксипропильными группами молекул ГПЦД.

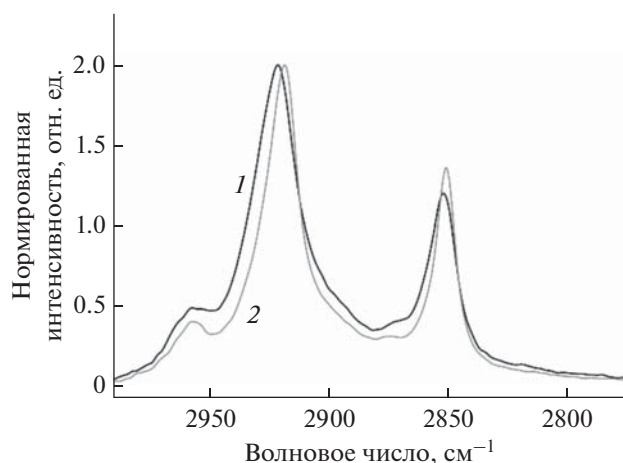
Полосы поглощения асимметричных и симметричных валентных колебаний  $\text{CH}_2$  групп претерпевают значительный низкочастотный сдвиг, указывающий на снижение подвижности гидрофобных цепей при связывании с ГПЦД. По-видимому, в процессе инкубации комплекса при  $50^\circ\text{C}$  циклодекстрина не только адсорбируется на поверхности липосом, но и заглубляется в “размягченный бислое”, что приводит к снижению подвижности гидрофобных цепей после охлаждения до комнатной температуры.

**Таблица 1.** Положения полос поглощения в ИК-спектре липосом (100% ДПФХ) при различных температурах инкубации с 2-гидроксирипил  $\beta$ -циклодекстрином,  $\text{см}^{-1}$ . В скобках дополнительно указаны обнаруженные плечи полос. 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4, 22°C

| Полоса поглощения                    | Без инкубации    | Температура предварительной инкубации комплексов |                                        |                                        |
|--------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
|                                      |                  | 25°C                                             | 37°C                                   | 50°C                                   |
| $C_{\text{ГПЦД}} = 20 \text{ мг/мл}$ |                  |                                                  |                                        |                                        |
| $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$       | $2919.3 \pm 0.2$ | $2919.3 \pm 0.2$                                 | $2919.0 \pm 0.2$                       | $2918.8 \pm 0.2$                       |
| $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$        | $2849.9 \pm 0.2$ | $2850.6 \pm 0.2$                                 | $2850.8 \pm 0.2$                       | $2851.3 \pm 0.2$                       |
| $\nu(\text{PO}_2^-)$                 | $1222.5 \pm 0.2$ | $1225.0 \pm 0.2$                                 | $1225.9 \pm 0.2$                       | $1226.6 \pm 0.2$                       |
| $\nu(\text{C=O})$                    | $1733.4 \pm 0.2$ | $1732.8 \pm 0.2$                                 | $1732.7 \pm 0.2$                       | $1731.5 \pm 0.2$                       |
| $C_{\text{ГПЦД}} = 40 \text{ мг/мл}$ |                  |                                                  |                                        |                                        |
| $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$       | $2919.4 \pm 0.2$ | $2919.6 \pm 0.2$                                 | $2919.3 \pm 0.2$                       | $2918.8 \pm 0.2$                       |
| $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$        | $2850.8 \pm 0.2$ | $2849.9 \pm 0.2$                                 | $2850.7 \pm 0.2$                       | $2850.0 \pm 0.2$                       |
| $\nu(\text{PO}_2^-)$                 | $1223.6 \pm 0.2$ | $1224.7 \pm 0.2$                                 | $1228.5 \pm 0.2$                       | $1233.6 \pm 0.2$                       |
| $\nu(\text{C=O})$                    | $1733.5 \pm 0.2$ | $1734.2 \pm 0.2$                                 | $1732.4 \pm 0.2$                       | $1731.8 \pm 0.2$                       |
| $C_{\text{ГПЦД}} = 60 \text{ мг/мл}$ |                  |                                                  |                                        |                                        |
| $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$       | $2919.1 \pm 0.2$ | $2919.8 \pm 0.2$                                 | $2917.1 \pm 0.2$                       | $2917.8 \pm 0.2$                       |
| $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$        | $2851.2 \pm 0.2$ | $2851.3 \pm 0.2$                                 | $2851.3 \pm 0.2$                       | $2850.1 \pm 0.2$                       |
| $\nu(\text{PO}_2^-)$                 | $1222.6 \pm 0.2$ | $1223.9 \pm 0.2$                                 | $1224.0 \pm 0.2$<br>(1214.0 $\pm$ 0.2) | $1242.7 \pm 0.2$<br>(1213.7 $\pm$ 0.2) |
| $\nu(\text{C=O})$                    | $1733.1 \pm 0.2$ | $1733.0 \pm 0.2$                                 | $1733.7 \pm 0.2$                       | $1732.2 \pm 0.2$                       |

Данная гипотеза подтверждается и данными по взаимодействию липосом с ГПЦД при предварительной инкубации при 37°C, где наблюдаются аналогичные сдвиги полос поглощения, но выра-

женные в меньшей степени. В то же время, полоса  $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$  уже смещается в область меньших волновых чисел, что свидетельствует о существенном снижении подвижности липидов в бислое.



**Рис. 2.** Положение полос поглощения ассиметричных и симметричных  $\text{CH}_2$  групп липосом ДПФХ 100% (1) и комплексов липосом ДПФХ 100% с 2-гидроксирипил  $\beta$ -циклодекстрином (60 мг/мл) после инкубации при 50°C (2) и последующего охлаждения. 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4, 22°C.

Таким образом, для образования комплекса ДПФХ 100% липосом с ГПЦД необходимо, чтобы везикулы находились в состоянии фазового перехода или жидкокристаллическом состоянии. Кроме того, концентрация ГПЦД должна быть не менее 40 мг/мл. Полученные результаты подтверждают литературные данные [5, 11, 16], что ГПЦД является одним из наиболее безопасных и не токсичных производных  $\beta$ -ЦД по отношению к мембране – для достижения заметного изменения физико-химических свойств необходимы предварительный нагрев и высокие концентрации ЦД.

Иная картина наблюдается при взаимодействии ГПЦД с двухкомпонентными анионными липосомами, содержащими 20% кардиолипина (КЛ), где помимо привнесения отрицательного заряда фосфатных групп, “конусообразный” КЛ разрыхляет бислой, способствуя образованию дефектов и снижая температуру фазового перехода [17]. Положение полос поглощения в ИК-спектре липосом в условиях образования комплекса с ГПЦД ( $C_{\text{ГПЦД}} = 60 \text{ мг/мл}$ , инкубация при 50°C) в зависимости от липидного состава (100%

**Таблица 2.** Положение полос поглощения в ИК-спектре липосом (100% ДПФХ и 80% ДПФХ/20% КЛ) в присутствии ГПЦД (60 мг/мл), температура предварительной инкубации 50°C. 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, рН 7.4, 22°C

| Колебания связей        | Липосомы (ДПФХ), см <sup>-1</sup> | Липосомы (ДПФХ) + ГПЦД, см <sup>-1</sup> | Липосомы (ДПФХ/КЛ), см <sup>-1</sup> | Липосомы (ДПФХ/КЛ) + ГПЦД, см <sup>-1</sup> |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|
|                         | 100% DPPC                         |                                          | 80% DPPC/20% CL                      |                                             |
| $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ | 2919.1 ± 0.2                      | 2917.8 ± 0.2                             | 2919.2 ± 0.2                         | 2921.1 ± 0.2                                |
| $\nu_s(\text{CH}_2)$    | 2851.2 ± 0.2                      | 2850.1 ± 0.2                             | 2851.5 ± 0.2                         | 2852.5 ± 0.2                                |
| $\nu(\text{PO}_2^-)$    | 1222.6 ± 0.2                      | 1242.7 ± 0.2<br>(1213.7 ± 0.2)           | 1225.0 ± 0.2                         | 1222.0 ± 0.2                                |
| $\nu(\text{C=O})$       | 1733.1 ± 0.2                      | 1732.2 ± 0.2                             | 1739 ± 0.2<br>(1723 ± 0.2)           | 1738.2 ± 0.2                                |

ДПФХ или ДПФХ/КЛ = 80/20%) представлены в табл. 2.

Взаимодействие анионных липосом (ДПФХ/КЛ = 80/20%) с ГПЦД обуславливает низкочастотные сдвиги полос поглощения  $\text{PO}_2^-$  и  $\text{C=O}$  групп (табл. 2), что указывает на повышение степени гидратации полярных групп липидов. Повышение степени гидратации карбонильных и фосфатных групп характерно при фазовом переходе липосом из гель-фазы в жидкокристаллическую фазу. Такие изменения организации липидов в бислое должны сопровождаться увеличением подвижности алифатических цепей липидов. Действительно, при образовании комплекса липосом (ДПФХ/КЛ = 80/20%) с ГПЦД наблюдается высокочастотный сдвиг полосы (табл. 2), соответствующий асимметричным колебаниям  $\text{CH}_2$  групп, на 2 см<sup>-1</sup>, что характерно при разупорядочении мембраны при переходе в жидкокристаллическое состояние [18].

Таким образом, в зависимости от липидного состава возможно два принципиально разных механизма взаимодействия ГПЦД с липидным бислоем. Для монокомпонентных липосомальных систем наблюдается преимущественная адсорбция ГПЦД на поверхности бислоя за счет образования водородных связей между гидроксильными группами ГПЦД и фосфатными группами ДПФХ. Кроме того, в условиях инкубации (50°C) возможно заглубление ГПЦД в “размягченный бислой”. Это приводит к снижению подвижности гидрофобных цепей после охлаждения до комнатной температуры. Взаимодействие ГПЦД с бислоем, содержащим КЛ, напротив, приводит к увеличению степени гидратации поверхностных фосфатных и карбонильных групп липидов, а также к увеличению подвижности ацильных цепей в гидрофобной части липидного бислоя. Подобные эффекты возможны вследствие образования дефектов в мембране, которые обусловлены неоднородностью липидного состава (“конусообраз-

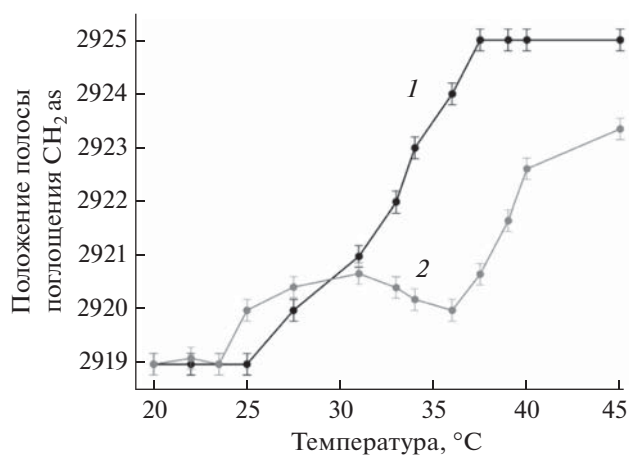
ной” геометрией КЛ), а также формированием микрофаз, обогащенных и обедненных КЛ [13]. Кроме того, в таких системах может происходить извлечение липидов из бислоя: так в литературе описано извлечение дипальмитоилфосфатидилхолина, 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, холестерина, дегидроэргостерола и других фосфолипидов из липосом и липидных монослоев под действием ЦД и их производных [11]. Более того, в экспериментах *in vitro* (*Mycobacterium* sp.) было показано, что ЦД извлекают липиды из клеточной стенки, тем самым повышая ее проницаемость для лекарственных молекул [19].

#### Влияние ГПЦД на температуру фазового перехода липосом

Для более глубокого понимания молекулярного механизма взаимодействия ГПЦД с бислоем, содержащим 20% КЛ, было рассмотрено влияние циклодекстрина на процесс фазового перехода в анионных липосомах. Температура фазового ( $T_m$ ) перехода является ключевой характеристикой липосомальной мембраны, описывающей состояние бислоя. Наиболее чувствительными к фазовому переходу в ИК-спектре липосом являются полосы поглощения гидрофобных цепей липидов. Ранее было показано, что положение полос асимметричных колебаний  $\text{CH}_2$  групп зависит от подвижности ацильных цепей: низкочастотный сдвиг указывает на более плотную упаковку липидов в бислое, а высокочастотный сдвиг свидетельствует о разупорядочивании бислоя [20].

Нейтральные липосомы (100% ДПФХ) характеризуются температурой фазового перехода ( $T_m$ ) в диапазоне от 40 до 44°C [14, 18]. Термограмма анионных липосом, содержащих КЛ (ДПФХ/КЛ = 80/20%), позволяет обнаружить основной фазовый переход при ~35–37°C и предварительный переход при 27–30°C (рис. 3), что свидетельствует о сосуществовании двух смешанных микрофаз, имеющих разное соотношение ДПФХ/КЛ. Ранее





**Рис. 3.** Термограмма контрольных липосом (1, ДПФХ/КЛ = 80/20%) и комплекса липосомы-ГПЦД (2,  $C_{\text{ГПЦД}} = 60$  мг/мл). 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4.

существование таких микрофаз для двухкомпонентных липосом (ДПФХ/КЛ) было продемонстрировано методом дифференциальной сканирующей калориметрией [13]. Согласно литературным данным фаза с более низким содержанием КЛ имеет более высокую температуру фазового перехода (35–37°C).

Образование комплекса липосомы-ГПЦД обуславливает выраженные изменения в термограмме: на начальном участке кривой характерно увеличение подвижности липидов вблизи температуры плавления микрофазы обогащенной КЛ (27°C), далее наблюдается выраженный минимум на 37°C, т.е. снижение подвижности липидов вблизи температуры плавления микрофазы с низким содержанием КЛ. По-видимому, связывание ГПЦД с микрофазой, обогащенной КЛ, в области первого фазового перехода (27°C) способствует разупорядочению мембраны и образованию дефектов в местах гетерогенности. При дальнейшем нагревании (35–37°C) наблюдается фазовый переход основной микрофазы – с высоким содержанием ДПФХ. В этом случае бислоем взаимодействует с ГПЦД по механизму, описанному для 100% ДПФХ липосом, где, напротив, наблюдается снижение подвижности ацильных цепей в бислое и стабилизация гелеобразного состояния за счет образования водородных связей фосфатных групп липидов с ГПЦД (табл. 1). Как следствие, температура фазового перехода комплекса ГПЦД с липидным кластером с низким содержанием КЛ (высокотемпературная часть термограммы на рис. 3) существенно выше по сравнению с липосомами в отсутствие ГПЦД и составляет порядка 39°C, т.е. близка к липосомальной системе, состоящей из 100% ДПФХ (41°C).

### Исследование целостности мембраны в присутствии ЦД

Для подтверждения гипотезы о возникновении дефектов в бислое и нарушении целостности мембраны под действием ГПЦД было исследовано влияние ГПЦД на целостность липосомальной мембраны (ДПФХ/КЛ = 80/20%). Одним из классических методов исследования целостности бислоя является исследование высвобождения красителей из везикул, например, флуорексона [21] и 6-карбоксифлуоресцеина [22], под действием внешних агентов в условиях, близких к физиологическим (перемешивание, 37°C).

В данной работе были получены липосомы, (ДПФХ/КЛ = 80/20%) загруженные индикатором фенолфталеином (ФФ) при pH 7.4. Липосомальная суспензия помещалась в диализный мешок и во внешний раствор натрий-боратного буферного раствора с pH 10.7. Поскольку раствор ФФ является бесцветным в нейтральных pH, а в щелочных условиях приобретает малиновую окраску, высвобождение ФФ из липосом должно сопровождаться увеличением интенсивности окраски внешнего раствора. Для детектирования красителя регистрировались УФ спектры: в спектре ФФ (боратный буфер pH 10.7) присутствует широкий пик поглощения с максимумом при длине волны 550 нм (рис. 4а).

Поскольку ионы буферных систем имеют маленькие размеры, то они способны проникать сквозь диализную мембрану, что с течением времени приводит к формированию градиента pH на границе растворов. Такое изменение микроокружения липосом может приводить к нарушению их стабильности без воздействия дополнительных веществ. Действительно, наблюдается постепенное высвобождение 30% красителя из контрольных липосом в течение 2 ч (рис. 4б). Добавление к липосомам поверхностно-активного вещества ТритонХ-100 приводит к 100% высвобождению красителя в течение 15 мин. Столь быстрое высвобождение обусловлено полным разрушением липосомального бислоя под действием детергента.

Связывание ГПЦД, как было показано методом ИК-спектроскопии Фурье, способно приводить к разупорядочению мембраны. При введении ГПЦД в суспензию липосом, загруженных индикатором, на начальном участке наблюдается ускоренное (по сравнению с контрольной системой) высвобождение: 30% ФФ высвобождается за 20 мин. Полное высвобождение ФФ происходит спустя 90 мин. Таким образом, взаимодействие ГПЦД с микрофазой КЛ приводит к возникновению в бислое дефектов, что обуславливает высвобождение веществ как из мембраны, так и возможность проникновения других внутрь.

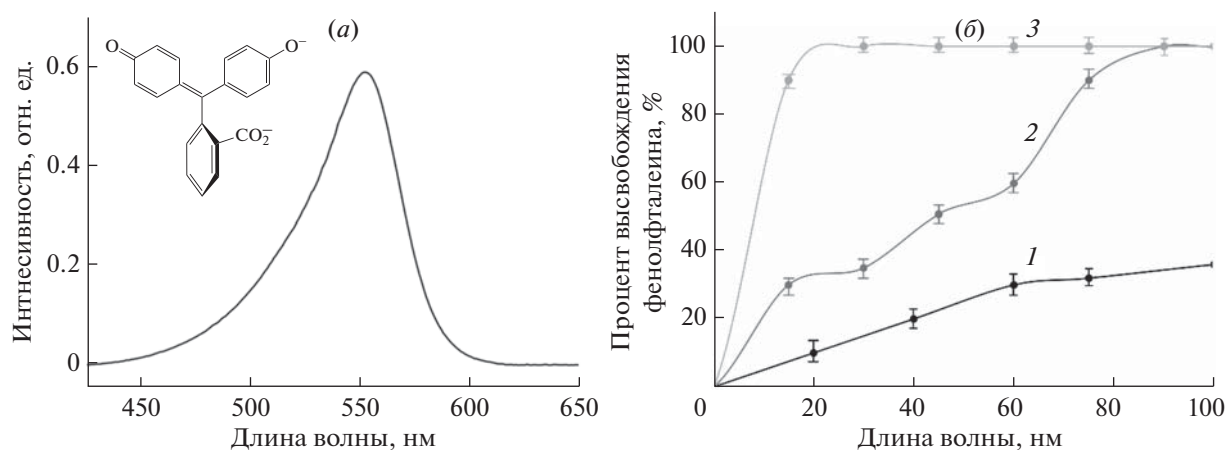


Рис. 4. (а) УФ-спектр фенолфталеина  $10^{-7}$  М, рН 10.7. (б) Кинетика высвобождения фенолфталеина из липосом (1), под действием 2-гидроксипропил  $\beta$ -циклодекстрина (2), ТритонаХ-100 (3),  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### Исследование адсорбции комплексов ГПЦД-левофлоксацин на липосомальном бислое

Поскольку нами был обнаружен эффект нарушения целостности мембраны ( $37^{\circ}\text{C}$ , ДПФХ/КЛ = 80/20%) под действием ГПЦД было исследовано влияния образования комплекса ГПЦД с лекарственной молекулой на взаимодействие с липидным бислоем. Можно ожидать, что комплексообразование лекарственных препаратов с производными ЦД способно обеспечить облегчение транспорта лекарственных препаратов сквозь бислой за счет образования дефектов. Для исследования данного эффекта в качестве лекарственной молекулы был использован левофлоксацин (ЛВ) – антибактериальный препарат широкого спектра действия группы фторхинолонов.

Исследование состояния ЛВ проводили методом спектроскопии кругового дихроизма (КД), применимого для исследования биологических объектов, имеющих хиральные центры [23]. Кроме того, данный метод позволяет получать детальную информацию о состоянии лекарственной молекулы в изучаемой многокомпонентной системе, поскольку ни липосомы, ни ГПЦД не имеют собственных КД-спектров.

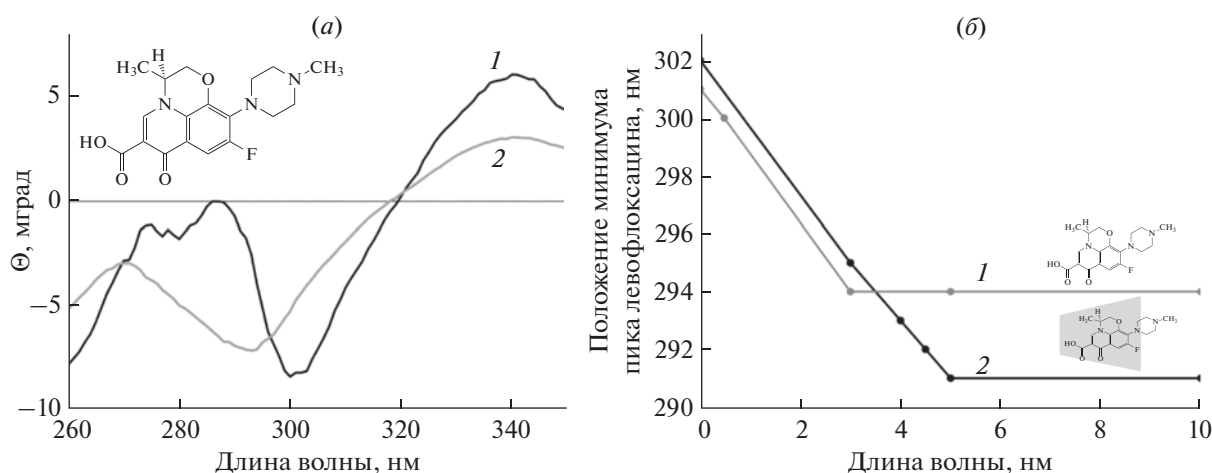
В КД спектре ЛВ наблюдается минимум на длине волны 301 нм (рис. 5а). Образование комплекса ЛВ с ГПЦД приводит к сдвигу КД спектра в сторону больших длин волн на 1 нм. Механизм образования комплексов фторхинолонов с производными ЦД заключается в погружении ароматического фрагмента лекарства внутрь гидрофобной полости ЦД [6]. Таким образом, сдвиг в КД спектре ЛВ свидетельствует об изменении его микроокружения на более гидрофобное. Действительно, красный сдвиг полосы характерен для комплексов ЛВ с каликсаренами [24], кроме того в независимом эксперименте нами было показано, что в

более гидрофобном растворителе (ДМСО) КД-спектр ЛВ имеет минимум на 305 нм.

При добавлении ЛВ к анионным двухкомпонентным липосомам (ДПФХ/КЛ = 80/20%), напротив, наблюдается существенный сдвиг полосы в сторону меньших длин волн с 301 нм до 294 нм (рис. 5б). Такие изменения могут быть обусловлены увеличением степени гидратации ЛВ или, что более вероятно, к изменению в состоянии ионизации ЛВ. Так, на примере липосомальной формуляции другого фторхинолона – моксифлоксацина [13] было показано, что взаимодействие положительно заряженного гетероцикла фторхинолона (при рН 7.4) с фосфатными группами КЛ на поверхности липосом приводит к аналогичным изменениям в КД-спектре. Наиболее вероятно, что добавление ЛВ к суспензии липосом приводит к адсорбции ЛВ на поверхности бислоя за счет электростатических взаимодействий противоположно заряженных фосфатных групп липосом КЛ и азота в гетероцикле молекулы ЛВ (рис. 5а).

Насыщение поверхности бислоя молекулами ЛВ наблюдается при трехкратном мольном избытке по отношению к липидам, при дальнейшем увеличении содержания ЛВ изменения положения полосы поглощения ЛВ в КД-спектре не происходит.

При добавлении комплекса ЛВ-ГПЦД к липосомам наблюдались аналогичные изменения в положении КД-спектра ЛВ (сдвиг полосы в сторону меньших длин волн). Однако по сравнению со свободным ЛВ происходит намного более выраженный синий сдвиг – на 11 нм. Столь значимое изменение положения пика ЛВ указывает на более эффективное взаимодействие ЛВ с поверхностью бислоя. Кроме того, насыщение наблюдается для мольного избытка ЛВ по отношению к ли-



**Рис. 5.** (а) КД-спектр свободного левофлоксацина (1)  $C = 2 \times 10^{-3}$  М и левофлоксацина, адсорбированного на поверхность липосом (ДПФХ/КЛ = 80/20%) (2), рН 7.4. (б) Положение минимума в КД-спектре левофлоксацина (2) и левофлоксацина, связанного в комплекс с 2-гидроксипропил β-циклодекстрина (1), адсорбированного на поверхность липосом (ДПФХ/КЛ = 80/20%), 37°C, рН 7.4.

пидам равного 5. Т.е. в присутствии ГПЦД на поверхности липосом образуется больше доступных участков связывания для ЛФ.

Комплекс ЛВ-ГПЦД образуется за счет погружения карбоксильной группы и ароматического фрагмента ЛВ внутрь полости ЦД. Положительно заряженный гетероцикл фторхинолона (рис. 5) расположен вне полости ГПЦД [6] и может участвовать в образовании прочных электростатических взаимодействий с фосфатными группами липидов. Способность ГПЦД взаимодействовать с бислоем и вызывать в нем дефекты обуславливает значительное увеличение адсорбции лекарственной молекулы на поверхности липосом, что не достигается в случае свободного лекарства. Этот механизм может лежать в основе увеличения био-

доступности фторхинолона включенного в комплекс с производными ЦД.

#### Исследование влияния ГПЦД на антибактериальную активность левофлоксацина

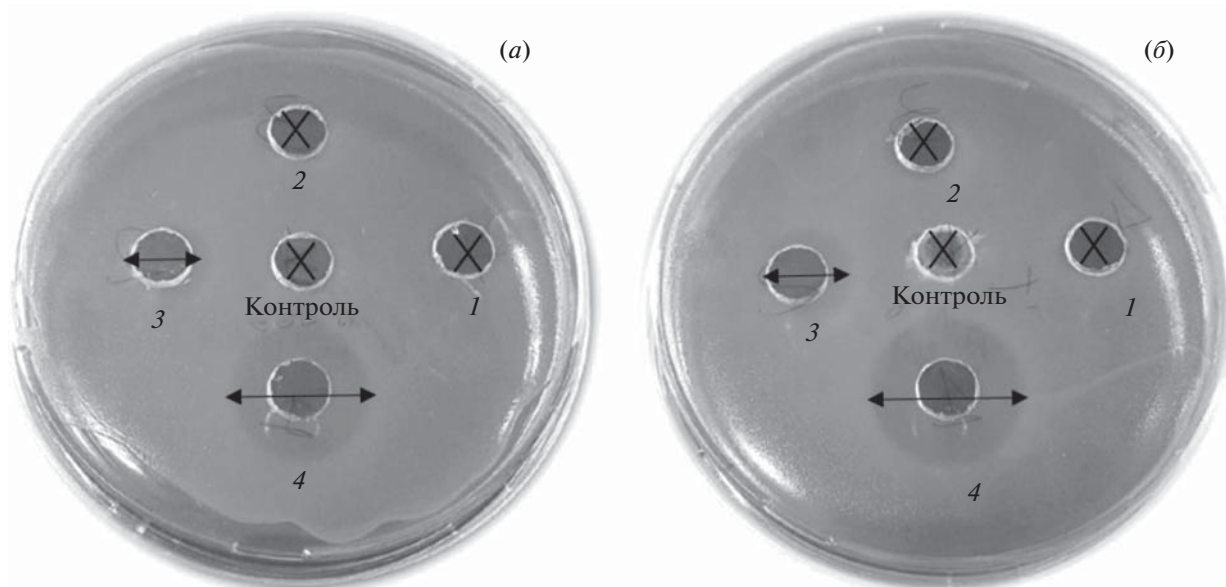
Для контроля влияния образования комплекса с ГПЦД на биологическую активность в работе исследована антибактериальная активность ЛВ-ГПЦД в сравнении со свободным ЛВ на штамме *Escherichia coli* МН-1. Определены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) фторхинолона в данных системах. Для этого из твердой питательной среды с нанесенной бактериальной культурой были вырезаны кусочки агара диаметром 9 мм. В лунку помещался образец (свободный ЛВ или комплекс ЛВ-ГПЦД в фосфатном буфере рН 7.4). Спустя 24 ч инкубации были оценены диаметры ингибирующего действия (рис. 6, табл. 3). Согласно полученным данным антибактериальная активность ЛВ (свободный и в комплексе) имеет концентрационную зависимость, что подтверждает специфичность действия антибактериального препарата. МИК свободного ЛВ составляет 0.2 мкг/мл. Комплекс ЛВ-ГПЦД характеризуется чуть большими значениями диаметров ингибирующего действия, чем свободный ЛВ, что, по-видимому, обусловлено более эффективным взаимодействием ГПЦД с мембраной клеток. Значение МИК для образца ЛВ-ГПЦД (0.17 мкг/мл) практически не отличается (в пределах погрешности) от таковой для свободного ЛВ.

Следует отметить, что свободные ЦД не проникают сквозь мембраны клеток [11]. Однако, взаимодействие ГПЦД с мембраной за счет обра-

**Таблица 3.** Значение диаметров ингибирующего действия левофлоксацина и его комплекса на *E. coli* на твердых питательных средах, инкубация 24 ч при 37°C, 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, рН 7.4

| №        | С <sub>ЛВ</sub> , мкг/мл | ЛВ       | Комплекс ЛВ + ГПЦД |
|----------|--------------------------|----------|--------------------|
| Контроль | 0                        | —        | —                  |
| 1        | 0.05                     | —        | —                  |
| 2        | 0.1                      | —        | —                  |
| 3        | 0.2                      | 11 ± 0.5 | 12 ± 0.5           |
| 4        | 1                        | 22 ± 0.5 | 24 ± 0.5           |





**Рис. 6.** Диаметры ингибирующего действия левофлоксацина (а) и его комплекса с 2-гидроксипропил  $\beta$ -циклодекстрином (б) на *E. coli* при концентрации левофлоксацина 0.05 (1), 0.1 (2), 0.2 (3) и 1 (4) мкг/мл, инкубация 24 ч при 37°C, 0.02 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7.4.

зования дефектов в бислое может обуславливать увеличение проникновения молекул ЛВ сквозь мембрану, что происходит после диссоциации комплекса. Таким образом, взаимодействие ГПЦД не снижает антибактериальную активность ЛВ, а имеет тенденцию к усилению действия препарата.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты.** 2-Гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин, фенолфталеин, левофлоксацин, ТритонХ-100 – Sigma-Aldrich (США); дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), кардиолипин (1',3'-бис[1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфо]-глицерол, КЛ) – Avanti Polar Lipids (США), соли для приготовления буферных растворов – ЭкоСервис (Россия), соляная кислота – Реахим (Россия).

**Получение липосом.** Из раствора липидов в хлороформе в концентрации 25 мг/мл ДПФХ или ДПФХ/КЛ (80/20%) (в весовом соотношении) удаляли органический растворитель на вакуумном ротормном испарителе при температуре 55°C. Полученную тонкую пленку липидов диспергировали в 0.02 М натрий-фосфатном буфере (pH 7.4) для достижения концентрации липидов 5 мг/мл. Далее раствор подвергали воздействию ультразвука (22 кГц) в течение 600 с (3  $\times$  200 с) в непрерывном режиме на диспергаторе 4710 “Cole-Parmer Instrument” (США) при температуре 50–55°C.

**Получение липосом, загруженных фенолфталеином.** Включение в липосомы индикатора проводили методом пассивной загрузки. Тонкую ли-

пидную пленку диспергировали в растворе 0.01 М фенолфталеина в 0.02 М натрий-фосфатном буферном растворе (pH 7.4). Далее раствор подвергали воздействию ультразвука (22 кГц) в течение 600 с (3  $\times$  200 с) в непрерывном режиме на диспергаторе 4710 “Cole-Parmer Instrument” (США) при температуре 50–55°C. Суспензию объемом 3 мл переносили в диализный мешок Orange Scientific (MWCO 3.5 кДа), который помещали в 500 мл 0.02 М натрий-фосфатного буферного раствора (pH 7.4). Диализ проводили в течение 1 ч с двукратной сменой внешнего буферного раствора.

**Получение комплексов липосом с ГПЦД.** К полученной суспензии липосом добавляли раствор 2-гидроксипропил  $\beta$ -циклодекстрина (200 мг/мл) для достижения концентрации ГПЦД в итоговой системе 20 мг/мл, 40 мг/мл или 60 мг/мл. Образцы инкубировали при перемешивании в течение суток при температуре 25, 37 или 50°C. Перед регистрацией ИК-спектров системы охлаждались до комнатной температуры.

**Регистрация термограмм.** Регистрировали ИК-спектры липосом ДПФХ/КЛ = 80/20% (5 мг/мл) или липосом в присутствии ГПЦД (60 мг/мл) в интервале температур 20–50°C. Определяли зависимость положения характеристических полос поглощения асимметричных колебаний  $\text{CH}_2$  групп от температуры.

**Получение комплексов 2-гидроксипропил  $\beta$ -циклодекстрина с левофлоксацином.** К 0.02 М раствору левофлоксацина в солянокислом буферном растворе (pH 4.0) добавляли 0.02 М раствор ГПЦД в

том же буферном растворе для достижения мольного соотношения ГПЦД : левофлоксацин = 1 : 1. Комплекс инкубировали при перемешивании в течение 1 ч при 37°C. Для проведения экспериментов по исследованию взаимодействия комплекса с поверхностью липосом, раствор разбавляли в 10 раз 0.02 М натрий-фосфатным буфером с контролем сохранности комплекса (рН 7.4) [6].

*Изучение высвобождения фенолфталеина из липосом.* 1 мл раствора липосом (5 мг/мл липидов, ДПФХ : КЛ = 80 : 20), загруженных фенолфталеином, переносили в диализный мешок Orange Scientific (MWSO 3.5 кДа), который помещали в 1 мл 0.02 М натрий-боратного буфера (рН 10.7). Растворы ГПЦД или ТритонаХ-100 добавляли к раствору липосом и помещали в диализный мешок. Системы инкубировались в течение 2 ч при перемешивании и температуре 37°C. Через определенные промежутки времени регистрировали УФ спектры внешнего раствора.

*Исследование антибактериальной активности левофлоксацина и его комплекса с ГПЦД in vitro.* Определение минимальной ингибирующей концентрации образцов ЛВ проводили на штамме *Escherichia coli* МН-1 (Michael Hall, США [25]). Бактерии культивировали в жидкой среде Luria-Bertani в течение 24 ч. Далее 500 мкл культуры равномерно распределяли по твердой питательной среде (Luria-Bertani) на чашке Петри; через 20 мин вырезали диски диаметром 9 мм. 50 мкл образца помещали в лунки и через 30 мин чашки Петри помещали в инкубатор 37°C. Спустя 24 ч были измерены диаметры ингибирования (отсутствия) роста бактерий.

*УФ-спектры* регистрировали на спектрометре УФ- и видимого диапазона AmerSharm Biosciences UltraSpec 2100 pro трижды в интервале от 200 до 400 нм в кварцевой кювете Hellma Analytics.

*ИК-спектры* регистрировали на ИК-спектрометре Фурье Tensor 27 “Bruker” (Германия), оснащенного МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, с термостатом фирмы “Huber” (США). Измерения проводили в термостатируемой ячейке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, BioATR-II, “Bruker”, Германия) с использованием кристалла однократного отражения ZnSe, при 22°C и постоянной скорости продувки системы сухим воздухом аппаратом “Jun-Air” (Германия). На кристалл ячейки НПВО наносили аликвоту (50 мкл) образца, спектр регистрировали трижды в интервале от 4000 до 950 см<sup>-1</sup>, с разрешением 1 см<sup>-1</sup>; производили 70-кратное сканирование и усреднение. Фон регистрировали аналогично. Спектры анализировали с помощью программы Orus 7.0.

*Спектры кругового дихроизма* регистрировали с помощью спектрометра J-815 фирмы “Jasco” (Япония), оснащенного термостатируемой ячейкой. Измерения проводили в диапазоне длин волн 260–350 нм при температуре 25°C в кварцевой кювете (l = 1 мм). Проводили трехкратную регистрацию спектров шагом в 1 нм.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован механизм взаимодействия 2-гидроксипропил β-циклодекстрина с липосомальным бислоем. Методом ИК-спектроскопии Фурье установлено, что для получения комплексов липосомы-ЦД необходима концентрация ГПЦД не менее 40 мг/мл и, чтобы липосомы находились в состоянии фазового перехода или жидкокристаллическом состоянии. В зависимости от состава липосом возможны два механизма взаимодействия ГПЦД с бислоем: для нейтральных монокомпонентных липосом характерно взаимодействие ГПЦД с фосфатными группами липидов с образованием водородных связей за счет гидроксипропильных заместителей в ГПЦД, что обуславливает связывание ЦД на поверхности липосом и последующее заглубление ЦД в “размягченный бислой”. Данный процесс сопровождается снижением подвижности липидов в бислое и стабилизацией гелеобразного состояния.

Для анионных двухкомпонентных липосом при взаимодействии с ГПЦД показано выраженное расслоение системы на микрофазы с разным содержанием КЛ и разной температурой фазового перехода. В области плавления микрофазы обогащенной КЛ в присутствии ГПЦД наблюдается увеличение степени гидратации поверхностных групп и увеличение подвижности ацильных цепей липидов за счет разупорядочения мембраны под действием ГПЦД. Взаимодействие ГПЦД с микрофазой обогащенной ДПФХ, напротив, приводит к стабилизации гелеобразного состояния этой микрофазы и, соответственно, к увеличению температуры основного фазового перехода  $T_m$ . Дестабилизация мембраны в областях гетерогенности под действием ГПЦД обуславливает нарушение целостности липидного бислоя и вытекание индикатора во внешнюю среду. Однако нарушение целостности мембраны не столь выражено, как под действием модельных поверхностно-активных веществ полностью разрушающих мембрану. Образование комплексов циклодекстрина с лекарственной молекулой обуславливает повышенную адсорбцию левофлоксацина на поверхности липосом, и повышенную проницаемость для лекарственной субстанции, что объясняется образованием дефектов в биомембране под дей-

ствием ЦД. Согласно исследованиям *in vitro* комплексы ЛВ-ГПЦД показывают высокую антибактериальную эффективность по отношению к клеткам *E. coli* – не ниже чем демонстрирует свободный ЛВ.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Loftsson T., Jarho P., Masson M., Jarvinen T. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. V. 36. P. 335–346. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00051-9)
- Stella V.J., He Q. // *Toxicol. Pathol.* 2008. V. 36. P. 30–42. <https://doi.org/10.1177/0192623307310945>
- Crini G., Fourmentin S., Fenyvesi É., Torri G., Fourmentin M., Morin-Crini N. // *Environ. Chem. Lett.* Springer International Publishing, 2018. V. 16. № 4. P. 1361–1375. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0763-2>
- Del Valle E.M.M. // *Process Biochem.* 2004. V. 39. P. 1033–1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9)
- Davis M.E., Brewster M. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. V. 3. P. 1023–1035. <https://doi.org/10.1038/nrd1576>
- Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Uporov I.V., Kudryashova E.V. // *Anal. Bioanal. Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2017. V. 409. P. 6451–6462. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0590-5>
- Skuredina A.A., Le-Deygen I.M., Uporov I.V., Kudryashova E.V. // *Colloid J.* 2017. V. 79. P. 668–676. <https://doi.org/10.1134/S1061933X17050143>
- Skuredina A.A., Le-Deygen I.M., Kudryashova E.V. // *Colloid J.* 2018. V. 80. P. 312–319. <https://doi.org/10.1134/S1061933X18030134>
- Saltzman W.M., Kyriakides T.R. // *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition.* Fourth Edi. Elsevier, 2013. P. 385–406. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00020-3>
- Schulz M., Olubummo A., Binder W.H. // *Soft Matter.* 2012. V. 8. № 18. P. 4849–4864. <https://doi.org/10.1039/c2sm06999g>
- Hammoud Z., Khreich N., Auezova L., Fourmentin S., Elaissari A., Greige-Gerges H. // *Int. J. Pharm.* Elsevier. 2019. V. 564. P. 59–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.063>
- Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K. // *AAPS Pharm-SciTech.* 2005. V. 2. P. 329–357. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.1.335>
- Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Safronova A.S., Yakimov I.D., Kolmogorov I.M., Deygen D.M., Burova T.V., Grinberg N.V., Grinberg V.Y., Kudryashova E.V. // *Chem. Phys. Lipids.* Elsevier Ireland Ltd. 2020. V. 228. P. 104891. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104891>
- Le-Дейген И.М., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. // *Биоорган. химия.* 2020. Т. 46. С. 340–359. [Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., and Kudryashova E.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 480–497.] doi 10.1134/S1068162020040123
- Deygen I.M., Seidl C., Kölmel D.K., Bednarek C., Heissler S., Kudryashova E. V., Bräse S., Schepers U. // *Langmuir.* 2016. V. 32. P. 10861–10869. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01023>
- Piel G., Piette M., Barillaro V., Castagne D., Evrard B., Delattre L. // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 338. P. 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.01.015>
- Yaroslavov A.A., Efimova A.A., Lobyshe, V.I., Kabanov V.A. // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2002. V. 1560. P. 14–24. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00453-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00453-9)
- Bilge D., Sahin I., Kazanci N., Severcan F. // *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier B.V. 2014. V. 130. P. 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.027>
- Donova M. V., Nikolayeva V.M., Dovbnya D.V., Gulevskaya S.A., Suzina N.E. // *Microbiology.* 2007. V. 153. P. 1981–1992. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001636-0>
- Le-Deygen I.M., Vlasova K.Y., Kutsenok E.O., Usvaliev A.D., Efremova M.V., Zhigachev A.O., Rudakovskaya P.G., Golovin D.Y., Gribanovsky S.L., Kudryashova E.V., Majouga A.G., Golovin Y.I., Kabanov A.V., Klyachko N.L. // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* Elsevier Inc. 2019. V. 21. P. 102065. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102065>
- Hatzi P., Mourtas S.G., Klepetsanis P., Antimisiaris S.G., // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 333. P. 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.059>
- Angelini G., Campestre C., Boncompagni S., Gasbarri C. // *Chem. Phys. Lipids.* Elsevier Ireland Ltd. 2017. V. 209. P. 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.09.004>
- Bertucci C., Pistozzi M., De Simone A. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 398. P. 155–166. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3959-2>
- Chamseddin C., Jira T. // *Curr. Pharm. Anal.* 2013. V. 9. P. 121–129. <https://doi.org/10.2174/157341213804806160>
- Goddard J.M., Caput D., Williams S.R., Martin D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 80. P. 4281–4285. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.14.4281>

## The Regulation of Lipid Membranes' Properties by Interaction with 2-Hydroxypropyl $\beta$ -Cyclodextrin. Molecular Details

A. A. Skuredina<sup>\*, #</sup>, A. S. Tychinina<sup>\*</sup>, I. M. Le-Deygen<sup>\*</sup>, N. G. Belogurova<sup>\*</sup>, and E. V. Kudryashova<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 939-34-34; e-mail: skuredinanna@gmail.com

<sup>\*</sup>Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1/3, Moscow, 119991 Russia

The work is devoted to the study of the mechanism of 2-hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin (HPCD) interaction with a liposomal bilayer. The main binding sites of HPCD on the surface of neutral liposomes based on dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) are phosphate groups of lipids. Complex formation with HPCD leads to stabilization of the gel state in monocomponent liposomes. The inclusion of the anionic component – cardiolipin (CL, 20%) in the bilayer yields a change in the mechanism of liposome-HPCD interaction: the lipid disorder is observed, leading to membrane integrity disturbance, which result in the dye release (phenolphthalein) loaded into the liposomes. The effect of HPCD on the process and phase transition parameters of anionic liposomes was studied using thermograms obtained on the basis of the change in the position of the absorption bands of lipid acyl chains in the FTIR spectrum of liposomes. A stratification of DPPC/CL (80%/20%) bilayer into two microphases with different cardiolipin content was detected. HPCD causes more pronounced stratification in the bilayer: membrane destabilization near the melting point of CL-rich microphase and vice versa, a decrease in lipid mobility in regions with a low CL content. Studying the effect of HPCD on the interaction of an antibacterial drug – levofloxacin (LV) with a lipid bilayer, it was found that the complexation of drug molecules with HPCD leads to an increase in the efficiency of drug adsorption on the surface of bilayer and might facilitate the transport of drugs through the bilayer due to the formation of defects in the membrane, while LV in the complex with HPCD shows high antibacterial efficiency *in vitro* on *E. coli*, not lower than in comparison with free LV.

*Keywords: cyclodextrins, liposomes, FTIR spectroscopy, CD spectroscopy, phase transition, antibacterial activity*