

На правах рукописи



Павлов Раис Валерьевич

**СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН НАНОКОНТЕЙНЕРОВ
ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ НЕКОВАЛЕНТНОЙ САМОСБОРКИ
ПАВ И ЛИПИДОВ**

Специальность 1.4.4. Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2023

Работа выполнена в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

Научный руководитель: кандидат химических наук
Гайнанова Гульнара Ахатовна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Горбачук Валерий Виленович,
профессор кафедры физической химии, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань

доктор химических наук, профессор
Горин Дмитрий Александрович,
профессор центра фотоники и фотонных технологий, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий», г. Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «**Санкт-Петербургский государственный университет**»

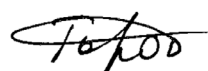
Защита диссертации состоится **14 июня 2023 года в 14 часов 30 минут** на заседании диссертационного совета 24.1.225.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» по адресу: 420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, большой конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН и на сайте <http://www.iopsc.ru/>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим присылать по адресу: 420088, г. Казань, ул. Академика Арбузова, д. 8, ИОФХ им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, ученому секретарю диссертационного совета, e-mail: toropchina@iopsc.ru.

Автореферат разослан «20» апреля 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета, кандидат химических наук



Торопчина А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Среди ключевых объектов физической и супрамолекулярной химии важное место занимают поверхностно-активные вещества (ПАВ), образующие в растворе агрегаты при достижении определенной концентрации. Такие агрегаты способны выступать в качестве наноконтейнеров для липофильных молекул-гостей (спектральных зондов, красителей, лекарств, пищевых добавок, реагентов), что обуславливает широкое практическое применение супрамолекулярных систем. Одним из важнейших прикладных аспектов является использование наноконтейнеров для решения ключевой проблемы современной медицины, связанной с необходимостью увеличения эффективности лекарственных средств. Применение супрамолекулярной стратегии позволяет нековалентно модифицировать свойства как самой лекарственной субстанции путем включения в наноконтейнеры (увеличение растворимости, стабильности, биодоступности, биосовместимости), так и свойства наноносителя, придавая ему таргетность и способность преодолевать биологические барьеры. Такой подход дает возможность варьировать состав композиции, не прибегая к сложным синтетическим процедурам, если ее первоначальный вариант не позволил достичь желаемого результата.

В рамках сформированного протокола по исследованию систем на основе ПАВ от направленного синтеза до биологических испытаний на настоящем этапе основное внимание уделяется поиску новых амфифильных соединений, удовлетворяющих критериям биомедицинской практики: включение в состав молекулы групп, способных к расщеплению в биологической среде, переход к амфифилам с несколькими заряженными и гидрофобными фрагментами. Это позволит минимизировать недостатки, присущие системам на основе синтетических ПАВ (проявление токсичности, экологические последствия) за счет снижения дозировок и способности к биоразложению. Среди различных типов наноконтейнеров особое место занимают липосомы, поскольку эти носители образованы биосовместимыми молекулами, универсальны по отношению к природе загружаемого субстрата, способны преодолевать биологические барьеры и наиболее исследованы. Новые поколения липосомальных систем доставки лекарств обладают потенциалом для устранения проблем низкой биодоступности лекарственных средств, их преждевременной деградации, отсутствия таргетности, высокой вероятности возникновения побочных эффектов. Одним из способов реализации этого потенциала, предложенным в диссертационной работе, является нековалентная модификация липосом амфифильными соединениями, прежде всего, катионными агентами. Катионная модификация липосом, в том числе новыми амфифильными соединениями, позволяет усиливать взаимодействие наноконтейнеров с клеточной мембраной. Вышеизложенное обуславливает актуальность представляемой работы, ее практическую значимость и научный потенциал.

Степень разработанности темы исследования. Липосомальные системы доставки лекарств являются объектом интенсивных исследований в научных группах всего мира с момента одобрения первого липосомального противоракового средства Doxil в 1995 году. В настоящее время традиционные липосомы в основном используют в качестве платформы, которую можно модифицировать ковалентным или нековалентным способами. На сегодняшний день липосомы, по-прежнему, занимают ведущее место в качестве наиболее востребованных в исследовательской и лечебной практике систем доставки лекарств различного назначения. Среди решаемых задач следует отметить адаптацию носителей к различным способам введения, комбинированную доставку двух или более препаратов, в том числе в рамках тераностики, преодоление биологических барьеров, улучшение адресности при терапии наиболее значимых заболеваний. Известно множество подвидов липидных наноконтейнеров: ниосом, трансферсом, этосом, керасом, порфисом и прочих везикулярных наночастиц, разработанных для решения таких задач. В то же время, среди огромной массы работ крайне малое число фо-

кусируется на модификации липосом синтетическими катионными ПАВ и исследовании влияния физико-химических свойств липосом (гидродинамический диаметр и дзета-потенциал) на их взаимодействие с клетками и способность преодолевать биологические барьеры.

Целью работы является поэтапная разработка новых липосомальных наноконтейнеров, модифицированных амфифильными соединениями, включающая исследование самоорганизации ПАВ в водном растворе, оптимизацию состава липосом, а также выявление взаимосвязи основных физико-химических параметров липосом как с природой модифицирующих компонентов, так и с проявляемой цитотоксической активностью и эффективностью взаимодействия с клетками.

Научная новизна работы:

1. Исследованы агрегационные и антимикробные свойства новых дикатионных геминальных ПАВ с карбаматными фрагментами; определены пороги агрегации с использованием различных методов и охарактеризованы минимальные бактериостатические и бактерицидные концентрации.

2. Впервые проведена нековалентная модификация липосом рядом дикатионных геминальных карбаматсодержащих ПАВ. Показана прямолинейная зависимость между интернализацией частиц клетками и их дзета-потенциалом с коэффициентом корреляции Пирсона $r = 0.922$.

3. Впервые получены органо-кремниевые гибридные наночастицы, модифицированные неионным и дикатионным геминальным ПАВ, для доставки противоракового препарата паклитаксела в клетки глиобластомы T98G.

4. Впервые получены порфисомы на основе фосфатидилхолина, холестерина и смеси нефтяных порфиринов в качестве наноконтейнеров для противоракового лекарства доксорубицина.

5. Впервые была осуществлена 27% реактивация ацетилхолинэстеразы мозга крыс, отравленных параоксоном, путем доставки через гематоэнцефалический барьер пралидоксима хлорида катионными липосомами, модифицированными геминальными гидроксиэтилированными ПАВ.

Методы исследования. В ходе выполнения исследований по теме диссертации применяли физико-химические методы, включая тензиометрию, кондуктометрию, спектрофотометрию, флуориметрию, динамическое и электрофоретическое рассеяние света, просвечивающую электронную микроскопию, спектроскопию ЯМР, масс-спектрометрию, потенциометрию.

Теоретическая и практическая значимость.

Теоретическая значимость работы заключается в получении результатов фундаментального характера по исследованию самоорганизации и функциональной активности новых дикатионных ПАВ и в обобщении полученных результатов на уровне закономерностей.

Сформированы супрамолекулярные наносистемы на основе новых геминальных карбаматсодержащих ПАВ, характеризующихся порогом агрегации в микромолярном диапазоне. Определена сольубилизационная емкость систем на основе геминальных ПАВ, превосходящая значения, установленные для традиционного мономерного катионного ПАВ цетилтриметиламмоний бромид в пересчете на гидрофобные углеводородные цепи амфифилов. Выявлена корреляция между дзета-потенциалом частиц и интенсивностью их поглощения клетками рака простаты РС-3, которая подчеркивает фундаментальную роль дзета-потенциала при разработке систем доставки лекарств. Выявлено влияние физико-химических параметров и морфологии систем на их функциональные свойства в качестве наноконтейнеров (эффективность инкапсулирования субстратов, профили высвобождения, клеточный захват).

Супрамолекулярные системы и наночастицы, сформированные с использованием липидов и ПАВ, могут быть использованы для совершенствования наномедицинских подходов при

лечении онкологических заболеваний и доставке лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер. Разработана методика получения наночастиц на основе фосфатидилхолина и керасоомобразующего липида, показан их потенциал в качестве системы доставки лекарственных средств для лечения глиобластомы. Сформирована липосомальная система доставки лекарств, модифицированная дикаатионным гидроксипропилированным геминальным ПАВ и способная доставлять субстрат в мозг крыс, преодолевая гематоэнцефалический барьер.

Показано, что порфирины, извлеченные из альтернативного источника (нефти), могут быть использованы для формирования модифицированных липосом – порфисом, способных дистанционно дестабилизироваться под воздействием видимого электромагнитного излучения, что можно использовать для контролируемого высвобождения лекарственного субстрата.

На защиту выносятся:

1. Количественные характеристики самоорганизации новых дикаатионных карбаматсодержащих геминальных ПАВ при варьировании длины гидрофобной части.
2. Оценка влияния доли карбаматсодержащих и гидроксипропилированных геминальных ПАВ в составе липосом на дзета-потенциал и стабильность модифицированных липосом.
3. Оптимизация методики получения гибридных липидных наноконтейнеров с силиконовой оболочкой – керасом – и их эффективность в качестве системы доставки противоракового агента паклитаксела в клетки глиобластомы T98G.
4. Апробация методики получения порфисом с использованием порфиринов, выделенных из нефти.
5. Оценка взаимосвязи между дзета-потенциалом липосомальных частиц и их поглощением клетками.
6. Установление способности катионных липосом, полученных при помощи модификации гидроксипропилированными геминальными ПАВ, преодолевать гематоэнцефалический барьер и доставлять гидрофильные субстраты в мозг.

Обоснованность и достоверность полученных результатов обусловлены применением широкого ряда физико-химических методов и подтверждаются хорошим согласованием данных. Результаты работы интерпретированы в рамках современных теоретических представлений, согласуются с имеющимися литературными данными, опубликованы в рецензируемых профильных и междисциплинарных журналах.

Апробация работы. Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на Всероссийских и Международных конференциях: I, II, III, IV Школах-конференциях для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) (Казань, 2019, 2020, 2021, 2022); 33-й и 35-й международных конференциях Европейского сообщества коллоидной химии и науки о межфазных границах (ECIS) (Лёвен, Бельгия, 2019; Афины, Греция, 2021); II и III Научных конференциях «Динамические процессы в химии элементоорганических соединений» (Казань, 2020, 2022); конференции с международным участием «Липиды 2021» (Москва, 2021); XXIII Международной конференции по химической термодинамике в России (Казань, 2022).

Публикации. Диссертационная работа включает материал 8 опубликованных статей в журналах, входящих в перечень, рекомендуемый ВАК РФ, и 10 тезисов докладов.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка условных обозначений и сокращений, списка использованной литературы (322 литературные ссылки на публикации отечественных и зарубежных авторов) и приложения. Общий объем диссертации составляет 180 страниц, включая 20 таблиц, 59 рисунков. Объем приложения 2 страницы.

Личный вклад автора. Материалы работы, приведенные в диссертации, получены лично автором или при его непосредственном участии. Соискатель самостоятельно анализировал актуальные литературные данные, принимал участие в постановке задач, подборе методик и разработке плана исследования; выполнял экспериментальную работу, анализировал и обрабатывал результаты физико-химических и биологических методов исследования, а также готовил материал к публикации в периодических изданиях по теме диссертации. Экспериментальная работа, проведенная непосредственно автором, включала исследование самоорганизации катионных ПАВ набором физико-химических методов, синтез керасомообразующего липида, формирование наночастиц (липосом, порфисом, керасом), их модификацию амфифильными соединениями, анализ значений гидродинамического диаметра и дзета-потенциала, а также проведение загрузки полученных наноконтейнеров субстратами и оценку параметров инкапсуляции и скорости высвобождения.

Автор искренне благодарен руководителю диссертационной работы с.н.с. Гайнановой Г.А., а также руководителю лаборатории Высокоорганизованных сред г.н.с. Захаровой Л.Я. за помощь в инициировании, координации и развитии исследований в рамках работы; с.н.с. Лукашенко С.С. и н.с. Кузнецову Д.М. за синтез катионных ПАВ и консультации по синтезу керасомообразующего липида; с.н.с. Волошиной А.Д., руководителю Международного научно-инновационного Центра нейрoхимии и фармакологии Петрову К.А. и в.н.с. Абдулину Т.И. за содействие в проведении биологических экспериментов и помощь в интерпретации полученных результатов; директору Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» Евтюгину В.Г. за проведение исследований с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии.

Работа выполнена в лаборатории Высокоорганизованных сред Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН. Работа проведена при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-73-30012 «Разработка супрамолекулярных стратегий для создания липидных и гибридных наноконтейнеров с функциями таргетности и способностью преодолевать биологические барьеры с целью увеличения эффективности лекарственных средств».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, представлены научная новизна проведенных исследований, их теоретическая и практическая значимость.

В **первой главе** представлен литературный обзор по высокоорганизованным средам на основе катионных ПАВ с фокусом на геминальных амфифилах и особенности их взаимодействия с биомолекулами, а также описано современное состояние научных разработок липосомальной платформы для доставки лекарственных препаратов.

Во **второй главе** охарактеризованы использованные в ходе выполнения работы коммерческие реагенты и синтезированные соединения, экспериментальные процедуры и протоколы, в подробностях описаны методика и особенности проведенных исследований.

Третья глава содержит обсуждение полученных результатов. В ней рассмотрены подробности самоорганизации новой серии карбаматсодержащих дикаатионных геминальных ПАВ, описаны разработанные липосомальные системы с применением исследованных ПАВ в качестве модификаторов, улучшающих доставку лекарств в раковые клетки и через гематоэнцефалический барьер.

Самоорганизация и антимикробная активность дикаationных геминальных ПАВ, содержащих карбаматные фрагменты

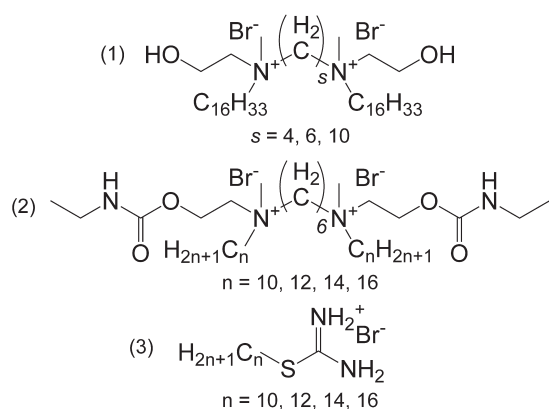


Рисунок 1. ПАВ, исследованные в работе: (1) N,N'-дигексадецил-N,N'-диметил-N,N'-бис(2-(гидрокси)этил)алкан- α,ω -диаммоний дибромид (16-s-16(OH)); (2) N,N'-диалкил-N,N'-диметил-N,N'-бис(2-(этилкарбамоилокси)этил)гексан- α,ω -диаммоний дибромид (n-6-n(Et)); (3) 2-алкилизотиурионий бромид (C_nSU).

Таблица 1. Значения порога агрегации карбаматсодержащих геминальных ПАВ, определенные методом тензиометрии, и термодинамические параметры адсорбции и свободной энергии мицеллообразования, 25 °С.

ПАВ	ККМ, моль/л	$\Delta\Gamma_{\text{max}} \cdot 10^{10}$, моль/см ²	A_{min} , нм ²	ΔG_{mic} , кДж/моль
10-6-10(Et)	$5.8 \cdot 10^{-3}$	0.73	2.26	-28.1
12-6-12(Et)	$5 \cdot 10^{-4}$	0.98	1.70	-34.2
14-6-14(Et)	$3 \cdot 10^{-5}$	1.39	1.19	-40.3
16-6-16(Et)	$3 \cdot 10^{-6}$	2.90	0.57	-48.2

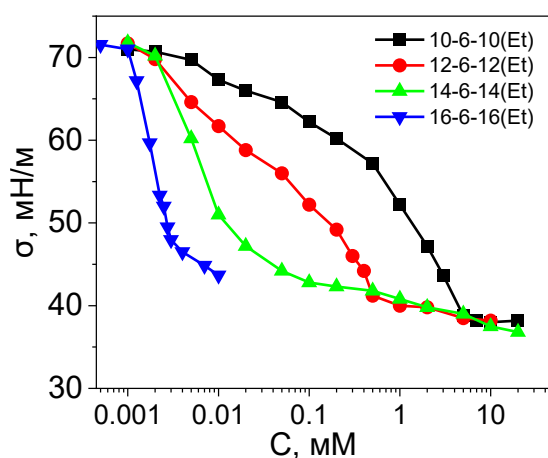


Рисунок 2. Изотермы поверхностного натяжения водных растворов катионных геминальных карбаматсодержащих ПАВ n-6-n(Et) (n = 10, 12, 14, 16), 25 °С.

Новая гомологическая серия карбаматсодержащих геминальных ПАВ n-6-n(Et) (где n = децил, додецил, тетрадецил, гексадецил, рисунок 1) была охарактеризована методами тензиометрии, кондуктометрии, спектрофотометрии и флуориметрии для определения концентрационных порогов образования агрегатов в водных растворах и солубилизационной емкости мицелл. Их антимикробный потенциал также был оценен по отношению к 9 различным штаммам микроорганизмов, в том числе к резистентным. Метод тензиометрии позволил количественно охарактеризовать значение критической концентрации мицеллообразования (ККМ) для каждого представителя гомологического ряда карбаматсодержащих геминальных ПАВ и рассчитать термодинамические параметры адсорбции

и мицеллообразования (рисунок 2, таблица 1).

Продемонстрированы типичный рост предельной адсорбции Γ_{max} и падение площади на мономер ПАВ в насыщенном адсорбционном слое A_{min} в ряду ПАВ с увеличивающейся длиной гидрофобной цепи. Анализ зависимости свободной энергии мицеллообразования от дли-

ны гидрофобных частей ПАВ позволил получить значение свободной энергии переноса метиленовой группы из воды в неполярное мицеллярное ядро, равное -3.3 кДж/моль (рисунок 3).

На зависимостях удельной электропроводности от концентрации ПАВ наблюдали сглаживание перегибов по мере увеличения длины гидрофобных заместителей ПАВ. Этот эффект незначительно проявлен в случае 10-6-10(Et), что позволяет обнаружить перегиб на зависимости, соответствующий ККМ децильного гомолога, в области 5.9 мМ.

Данные по солубилизации Оранжевого OT (ООТ) предоставляют две значимые характеристики исследуемых ПАВ: значения ККМ и солубилизационной емкости (рисунок 4 а). Анализ спектров флу-

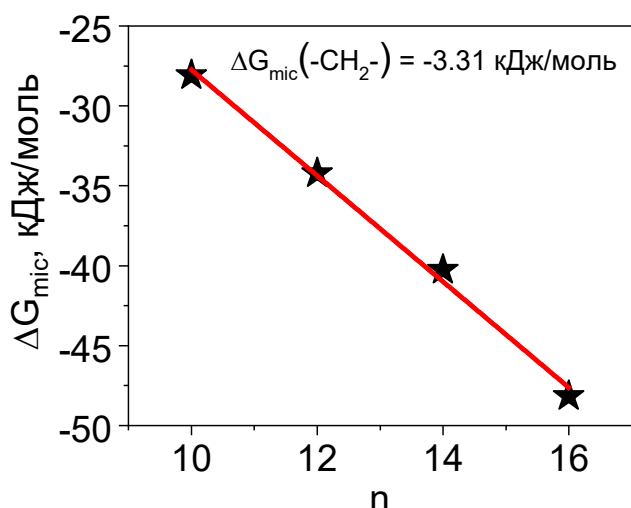
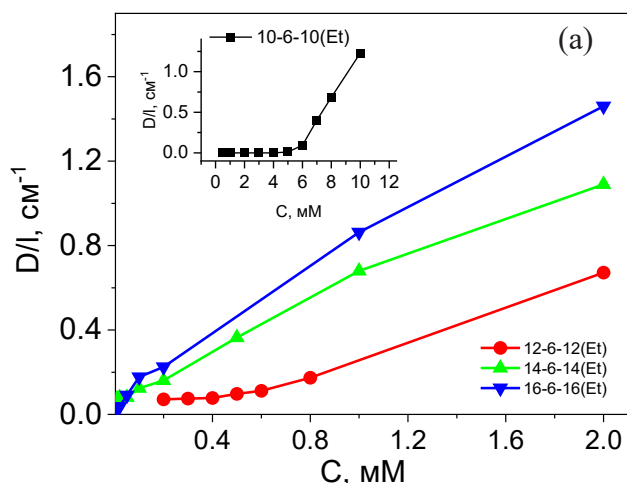


Рисунок 3. Зависимость свободной энергии мицеллообразования карбаматсодержащих геминальных ПАВ от числа атомов углерода в алкильном радикале ПАВ (n).



оресценции пирена в водных растворах ПАВ является чувствительным и информативным методом, позволяющим не только определять концентрационные пороги мицеллообразования, но и сравнивать на качественном уровне микрополярность внутри агрегатов (рисунок 4 б). Значения ККМ, полученные из анализа спектров поглощения Оранжевого Т и флуоресценции пирена, представлены в таблице 2. Наименьшее значение солубилизационной емкости, наблюдаемое для децильного гомолога 10-6-10(Et), составляет $0.015 \text{ моль}_{\text{ООТ}}/\text{моль}_{\text{ПАВ}}$, что находится на уровне мономерных ПАВ додецилсульфата натрия (ДСН) или додецилтриметиламмония бромид (ДТАБ) (0.012 и $0.014 \text{ моль}_{\text{ООТ}}/\text{моль}_{\text{ПАВ}}$ соответственно) (таблица 3). Для гексадецильного гомо-

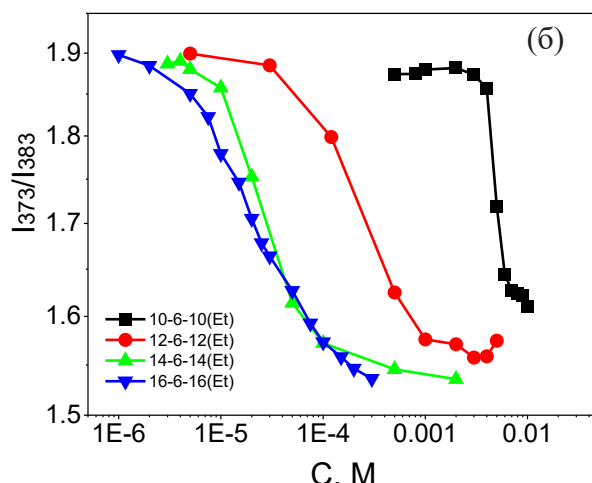


Рисунок 4. (а) Приведенная оптическая плотность водных растворов ПАВ, солубилизирующих гидрофобный краситель ООТ, при различной концентрации, $\lambda=492 \text{ нм}$, 25°C . (б) Зависимость отношения интенсивностей флуоресценции первого (373 нм) и третьего (383 нм) колебательных пиков пирена от концентрации катионных геминальных карбаматсодержащих ПАВ n-6-n(Et), 25°C .

Таблица 2. Значения порога агрегации карбаматсодержащих геминальных ПАВ, установленные методами спектрофотометрии и флуориметрии, и параметра полярности, 25°C .

ПАВ	ККМ, М		Параметр полярности I_{373}/I_{383}
	Спектрофотометрия	Флуориметрия	
10-6-10(Et)	$6 \cdot 10^{-3}$	$4.8 \cdot 10^{-3}$	1.6
12-6-12(Et)	$5 \cdot 10^{-4}$	$3.9 \cdot 10^{-4}$	1.5
14-6-14(Et)	$4 \cdot 10^{-5}$	$4.3 \cdot 10^{-5}$	1.4
16-6-16(Et)	$2 \cdot 10^{-5}$	$1.6 \cdot 10^{-5}$	1.4

лога карбаматсодержащих геминальных ПАВ зарегистрировано значение $0.040 \text{ моль}_{\text{ООТ}}/\text{моль}_{\text{ПАВ}}$, которое значительно выше, чем для гексадецилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) ($0.015 \text{ моль}_{\text{ООТ}}/\text{моль}_{\text{ПАВ}}$). Аналогичное геминальное ПАВ с гидроксизетильными фрагментами в головной группе обладает более низкой солубилизационной емкостью по отношению

Таблица 3. Солюбилизационная емкость и числа агрегации для мицелл на основе карбаматсодержащих и различных ранее исследованных ПАВ.

ПАВ	S, моль _{ООТ} /моль _{ПАВ}	N
10-6-10(Et)	0.015	51*
12-6-12(Et)	0.024	40*
14-6-14(Et)	0.032	29*
16-6-16(Et)	0.040	19*
16-6-16(OH)	0.0365 [1]	18* [1]
ЦТАБ	0.015 [2]	67** [4]
ДТАБ	0.014 [3]	52** [4]
ДСН	0.012 [3]	54** [4]

* – рассчитано по методу Шотта. ** – определено методом тушения флуоресценции пирена цетилпиридиний бромидом.

Данное явление может объясняться тем, что для детектирования агрегации с применением зондовых молекул необходима солюбилизация зонда молекулами ПАВ, что может завышать значения ККМ до тех пор, пока не будет возможно удержание зонда в агрегатах.

Значения минимальных ингибирующих (МИК) и бактерицидных (МБК) концентраций карбаматсодержащих геминальных ПАВ (таблица 4) по отношению к грамположительным бактериям *Sa*, *Bc*, *Ef* близки к ципрофлоксацину, в то же время 10-6-10(Et) и 14-6-14(Et) проявляют значительно меньшую активность по отношению к грамотрицательным бактериям *Ec*, *Pa*, чем антибиотик сравнения. При этом ципрофлоксацин на два порядка менее эффективен против резистентного штамма *MRSA-1*, а карбаматсодержащие геминальные ПАВ демонстрируют МИК в микрограммовом диапазоне, что делает их в 250 раз более активными, чем антибиотик сравнения. Среди ПАВ наиболее токсичен по отношению ко всем бактериям 12-6-12(Et), наименее токсичны ПАВ 14-6-14(Et) и 16-6-16(Et).

Таблица 4. Антимикробная активность дикатионных карбаматсодержащих геминальных ПАВ.

Соединение	МИК, мкг/мл						
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ef</i>	<i>MRSA-1</i>	<i>MRSA-2</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>
10-6-10(Et)	0.9±0.07	1.9±0.1	0.9±0.07	0.5±0.04	0.5±0.03	3.9±0.2	31±3
12-6-12(Et)	0.5±0.04	0.9±0.07	0.9±0.06	0.5±0.03	0.5±0.04	0.9±0.07	3.9±0.2
14-6-14(Et)	3.9±0.2	3.9±0.3	3.9±0.2	1.9±0.1	1.9±0.1	16±1	63±6
16-6-16(Et)	16±1	63±5	63±5	31±3	16±1	63±6	63±6
Ципрофлоксацин	0.5±0.03	0.5±0.04	3.9±0.3	125±11	0.9±0.07	0.5±0.03	0.5±0.03
МБК, мкг/мл							
10-6-10 (Et)	7.8±0.6	16±1	31±3	0.5±0.05	0.5±0.04	16±1	-
12-6-12 (Et)	31±3	16±1	3.9±0.2	0.5±0.05	0.5±0.03	7.8±0.5	-
14-6-14 (Et)	63±6	16±1	31±3	1.9±0.1	1.9±0.1	16±1	-
16-6-16 (Et)	31±3	-	125±10	31±3	16±1	63±6	-
Ципрофлоксацин	0.5±0.03	0.5±0.04	3.9±0.3	250±19	0.9±0.06	0.5±0.03	0.5±0.03

к зонду ООТ (0.0365 моль_{ООТ}/моль_{ПАВ}), что может быть обусловлено вкладом карбаматных фрагментов, увеличивающих солюбилизирующую способность ПАВ. Показано, что высшие гомологи геминальных ПАВ обладают преимуществом перед мономерными ПАВ в солюбилизации гидрофобных субстратов, несмотря на повышенную полярность мицеллярного ядра в зоне локализации флуоресцентного зонда пирена.

Значения порога агрегации для всех исследованных ПАВ с длиной гидрофобных заместителей от 10 до 14 атомов углерода, полученные различными методами, хорошо сходятся между собой, однако в случае 16-6-16(Et) значение ККМ, установленное методом тензиометрии, отличается от значений, полученных методом спектрофотометрии по солюбилизации ООТ и методом флуориметрии с использованием пирена, на порядок.

В ряду геминальных ПАВ наиболее активным соединением является 12-6-12(Et), что проявляется в виде минимума на графиках (рисунок 5). Такое явление не наблюдается в случае мономерных катионных изотиуруниевых ПАВ. Среди исследованных серий катионных ПАВ наиболее яркие антимикробные свойства проявляют карбаматсодержащие геминальные ПАВ, в среднем демонстрирующие на порядок более низкие значения МИК и МБК по сравнению с изотиуруниевыми амфифилами.

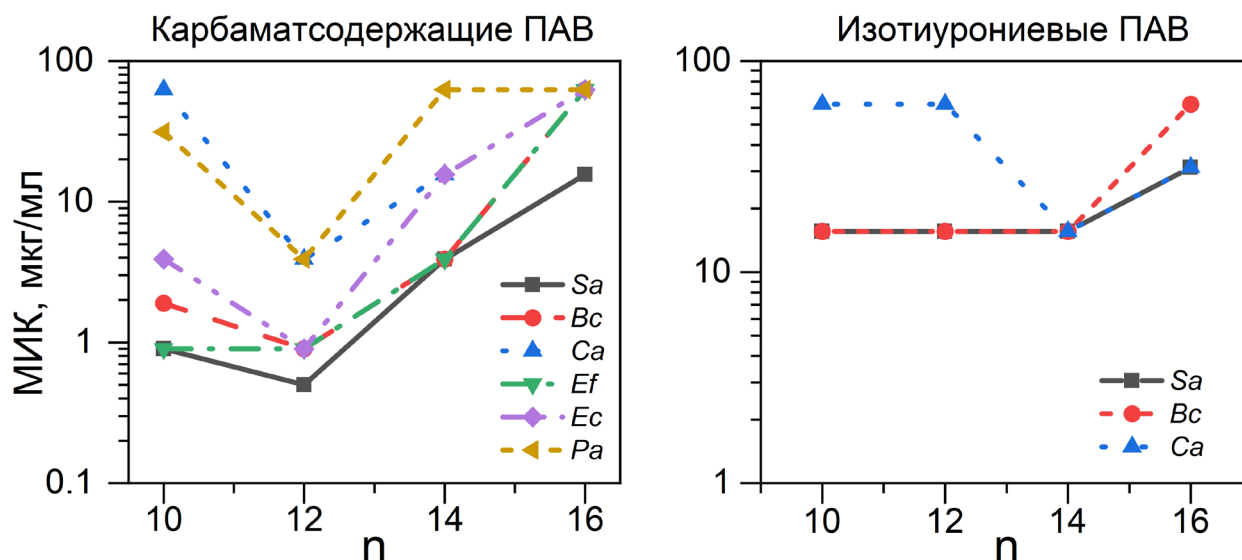


Рисунок 5. Зависимость значений МИК для серий карбаматсодержащих геминальных и изотиуруниевых ПАВ от числа атомов углерода в гидрофобной части ПАВ (n).

Разработка катионных липосом с включением липида ДОТАП, нековалентно модифицированных амфифильными пептидами C_{12} -GGRGD-NH₂ и C_{12} -GGGHK-NH₂

Липосомы на основе фосфатидилхолина (ФХ), холестерина (Хол) и катионного липида ДОТАП модифицировали амфифильными пептидами двумя методами: добавление пептида к липидной плёнке с последующей ее гидратацией (метод 1) и пост-встраивание пептида (метод 2) в готовые липосомы. В присутствии буфера проводили сравнение модификации липосом по методам 1 и 2. Для метода 2 немодифицированные липосомы инкубировали с пептидами в течение 120 мин. Такие липосомы обладают заметно более высокими значениями гидродинамического диаметра (в среднем на 16.6%) и индекса полидисперсности, а также более отчетливыми изменениями в значениях дзета-потенциала по сравнению с немодифицированными липосомами (таблица 5). Наблюдается более явное проявление эффектов пептидов на дзета-потенциал, которое можно объяснить их преимущественной локализацией на внешней поверхности липосомальной мембраны, тогда как в случае метода 1 они, вероятнее всего, равномерно распределены на внешней и внутренней поверхностях мембраны. В случае последовательности GGGHK наблюдали повышение дзета-потенциала до +27.4 мВ, а для пептида GGRGD – понижение до +11.6 мВ.

Методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) проанализированы различные композиции ФХ/Хол/ДОТАП (молярные соотношения 4:1:0.143) с пептидами, полученные согласно методу 1. Немодифицированные липосомы представляют собой округлые структуры с диаметром 104 нм. Некоторые липосомы имеют тенденцию к агрегации и образованию более крупных структур, по-видимому, продуктов слияния вследствие испарения жидкости в условиях съемки (рисунок 6). В случае модифицированных пептидами липосом не наблюдается высокой степени взаимодействия между частицами, что может быть индикатором их

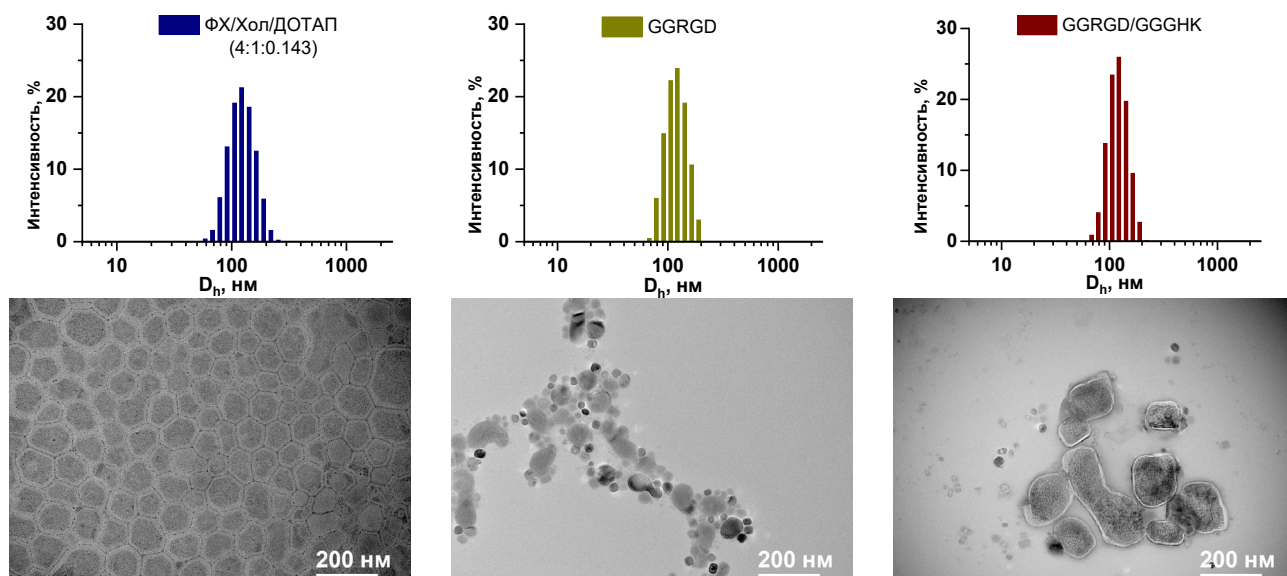


Рисунок 6. Распределение частиц по размеру, усредненное по интенсивности, немодифицированных и модифицированных пептидами липосом ФХ/Хол/ДОТАП (4:1:0.143) в деионизированной воде. ПЭМ-изображения соответствующих образцов липосом.

Таблица 5. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ) катионных липосом ФХ/Хол/ДОТАП (4:1:0.143), модифицированных амфифильными пептидами GGRGD и GGGHK методами 1 и 2.*

Модифицирующий пептид	D_h , нм	ζ , мВ	PdI
Метод 1			
-	101 ± 1	18.9 ± 0.6	0.052 ± 0.005
GGRGD	102 ± 1	16.2 ± 0.6	0.069 ± 0.007
GGGHK	101 ± 2	23.1 ± 0.3	0.038 ± 0.016
GGRGD/GGGHK	99 ± 3	16.6 ± 0.4	0.086 ± 0.027
Метод 2			
GGRGD	120 ± 2	11.6 ± 0.7	0.119 ± 0.019
GGGHK	117 ± 3	27.4 ± 0.6	0.113 ± 0.018
GGRGD/GGGHK	114 ± 1	23.7 ± 0.5	0.110 ± 0.017

*Липосомы анализировали при pH=7.4, при концентрации липидов 1 мМ и мольном соотношении пептид-липид 1:25.

способствует уменьшению взаимодействия частиц друг с другом. Модификация амфифильными соединениями по методу 2 повышает гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности частиц, что неоптимально для дальнейших *in vivo* экспериментов.

Модуляция дзета-потенциала липосом путём встраивания катионных ПАВ в липидный бислой

Анализ дзета-потенциала липосом ФХ/Хол (3:2), модифицированных геминальным дикатионным ПАВ 14-6-14(Et) и монокатионным ПАВ ЦТАБ методом пост-встраивания, проводили при фиксированном физиологическом значении pH = 7.4 в буферных растворах для

повышенной стабильности, обусловленной стерическим экранированием за счет объемных полярных групп GGRGD и GGGHK, выступающих на поверхности.

Таким образом, проведены сравнение характеристик, полученных методом динамического рассеяния света (ДРС), и анализ изображений ПЭМ для катионных липосом после модификации амфифильными пептидами GGRGD и GGGHK методами гидратации тонкой липидной пленки и пост-встраивания. Согласно результатам ПЭМ, включение пептидов в состав липосом методом 1 способ-

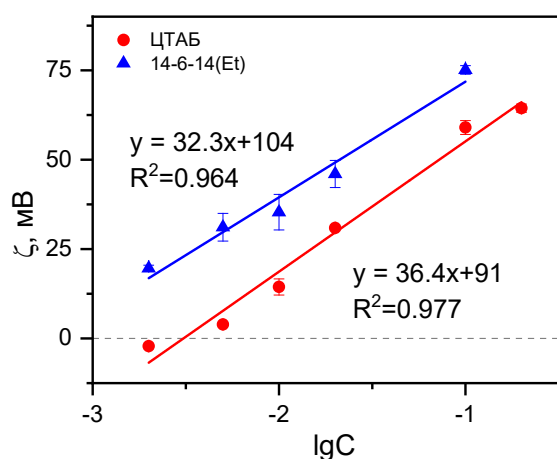


Рисунок 7. Зависимость дзета-потенциала липосом композиции ФХ/Хол 3:2 от логарифма концентрации модифицирующего ПАВ, 25 °С, рН = 7.4.

контроля степени ионизации и нивелирования отклонения дзета-потенциала из-за смещения кислотно-основного равновесия (рисунок 7). Добавление 0.04 мол.% монокатионного ПАВ ЦТАБ повышает дзета-потенциал до -2.2 мВ, но не приводит к перезарядке мембраны липосом. Идентичное количество карбаматсодержащего ПАВ 14-6-14(Et) скачкообразно повышает дзета-потенциал частиц до +19.6 мВ, что может быть обусловлено наличием сразу двух положительно заряженных аммонийных групп в его составе. С увеличением концентрации исследованных ПАВ дзета-потенциал на первых стадиях резко возрастает, при более высоких концентрациях рост значений дзета-потенциала замедляется. В случае геминального ПАВ после 2 мол.% наблюдается максимальное значение дзета-потенциала +75 мВ, а в случае ЦТАБ при 2 мол.% достигается значение +64 мВ. Важно отметить, что в исследованном диапазоне концентраций значение ККМ 14-6-14(Et) достигается уже при 1 мол.% (0.05 мМ) 14-6-14(Et), тогда как для ЦТАБ значение ККМ достигается только в конечной точке 16.6 мол.% (1 мМ). При одинаковых мольных соотношениях с липидами геминальное ПАВ обеспечивает более высокий дзета-потенциал. Кроме того, геминальные ПАВ обладают более высоким сродством к липидному бислою вследствие наличия гидрофобного спейсера и эффективно встраиваются в мембраны липосом, не приводя к сольюбилизации мембраны даже при концентрациях, превышающих ККМ. Включение в состав липосом амфифильных соединений по методу 2 приводит к повышению гидродинамического диаметра и индекса полидисперсности. Поэтому все липосомы, модифицированные геминальными ПАВ и описанные в диссертационной работе далее, получены по методу 1 (гидратацией тонкой липидной пленки).

Нековалентная модификация липосом дикатионными карбаматсодержащими ПАВ и амфифильным пептидом C₁₆-SSRGD-NH₂

Таблица 6. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ) немодифицированных и катионных липосом состава ФХ/Хол (3:2) с добавлением 1/150 кумарина 6 при включении амфифильного пептида SSRGD.

Липосомы	Мольная доля SSRGD	D _h , нм	PdI	ζ, мВ
ФХ/Хол (3:2)	-	139 ± 2	0.177	-0.7 ± 0.9
ФХ/Хол/ДОТАП (3:2:0.143)	-	131 ± 1	0.090	+14.8 ± 0.5
ФХ/Хол/14-6-14(Et) (3:2:0.143)	-	136 ± 7	0.152	+40 ± 3
ФХ/Хол (3:2)	1/25	120 ± 1	0.166	-24 ± 1
ФХ/Хол/ДОТАП (3:2:0.143)	1/25	117 ± 2	0.122	+12.6 ± 0.3
ФХ/Хол/14-6-14(Et) (3:2:0.143)	1/25	123 ± 1	0.140	+18 ± 2

Гомологический ряд ПАВ с карбаматными фрагментами применяли для регулирования дзета-потенциала липосом и сравнивали результаты с катионным липидом ДОТАП, который широко применяется в доставке нуклеиновых кислот и для создания катионных липосом. Модификация липосом амфифильным пептидом SSRGD (таблица 6) значительно понижает дзета-потенциал

в случае исходных липосом состава ФХ/Хол (3:2) и липосом с добавлением ПАВ 14-6-14(Et) (снижение значения ζ на 22–23 мВ), но в случае липосом с включением ДОТАП дзета-потен-

циал снижается менее выражено (на 2 мВ). Возможно, это связано с тем, что аммонийные группы ДОТАП располагаются у поверхности мембраны, а в случае катионного ПАВ они погружены внутрь и более экранированы головной группой пептида. Углубленное расположение заряженных групп ПАВ может быть связано с тем, что в его структуре отсутствует глицериновый фрагмент между гидрофобными радикалами и аммонийными группами. По результатам исследования цитотоксичности ПАВ 14-6-14(Et) было выбрано как оптимальное соединение для нековалентной модификации липосом при дальнейшем выполнении работы.

Методом проточной цитометрии показано, что наиболее интенсивное поглощение наблюдается в комбинации пептида SSRGD и катионного ПАВ 14-6-14(Et). При этом статистически достоверная разница установлена только при сравнении немодифицированных липосом и катионных образцов с SSRGD (рисунок 8 а). На изображениях ПЭМ липосом ФХ/Хол/14-6-14(Et) (3:2:0.143) наблюдали сферические агрегаты диаметром около 120 нм (рисунок 8 б).

Интернализация частиц, обусловленная положительным зарядом, неспецифична, и

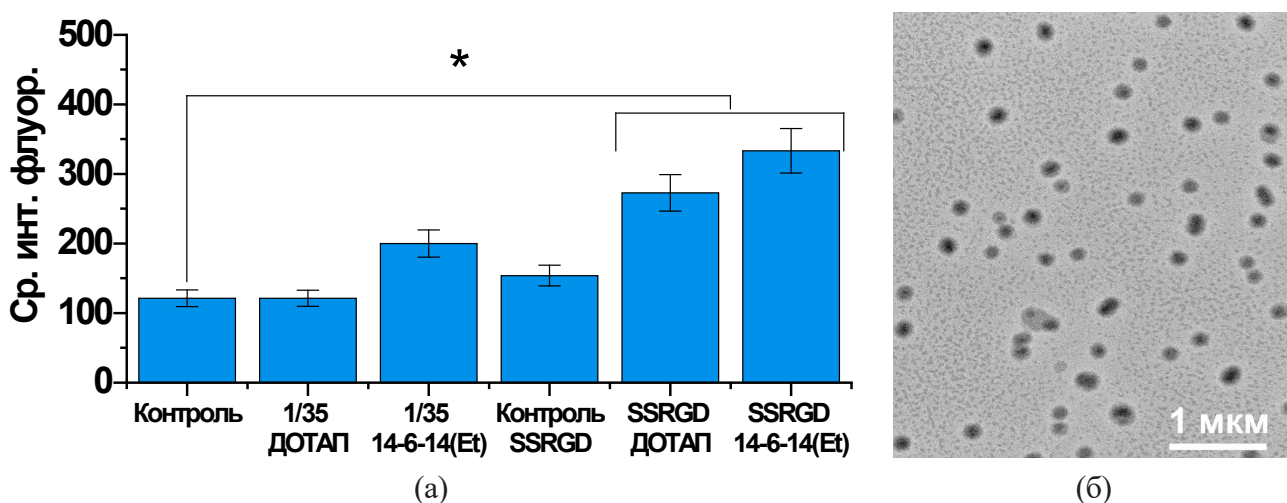


Рисунок 8. (а) Поглощение клетками РС-3 немодифицированных и катионных липосом ФХ/Хол (3:2), полученных включением ДОТАП и ПАВ 14-6-14(Et), без добавления и с добавлением амфифильного пептида SSRGD. * $p < 0.05$. (б) ПЭМ-изображения образца липосом ФХ/Хол (3:2), модифицированных ПАВ 14-6-14(Et) в соотношении 1/35.

модификацию катионными ПАВ можно комбинировать с включением лигандов, которые увеличивают поглощение за счет комплементарных взаимодействий для наилучшей эффективности и нацеленного действия наночастиц. Такая комбинация, как катионное геминальное ПАВ и амфифильный пептид SSRGD, перспективна для дальнейших исследований в области разработки систем доставки химиотерапевтических препаратов. Кроме того, обобщение результатов проточной цитометрии позволило зарегистрировать прямую зависимость между поглощением липосом клетками и их дзета-потенциалом с коэффициентом корреляции Пирсона 0.922 (рисунок 9).

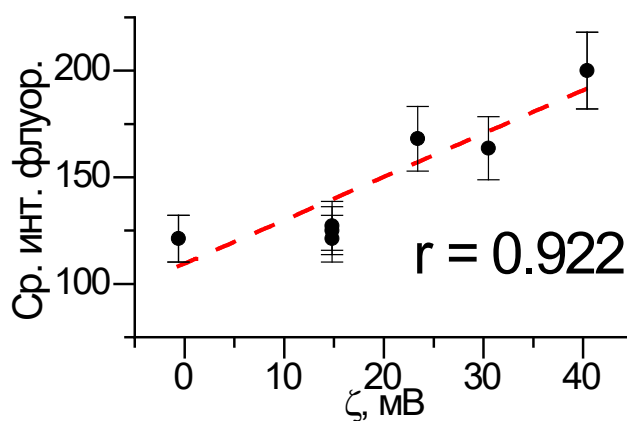


Рисунок 9. Корреляция между дзета-потенциалом липосом и их поглощением клетками.

Для установления эффективности разработанных липосомальных систем при транспортировке лекарственных средств в клетки образцы липосом, а именно, 1) немодифицирован-

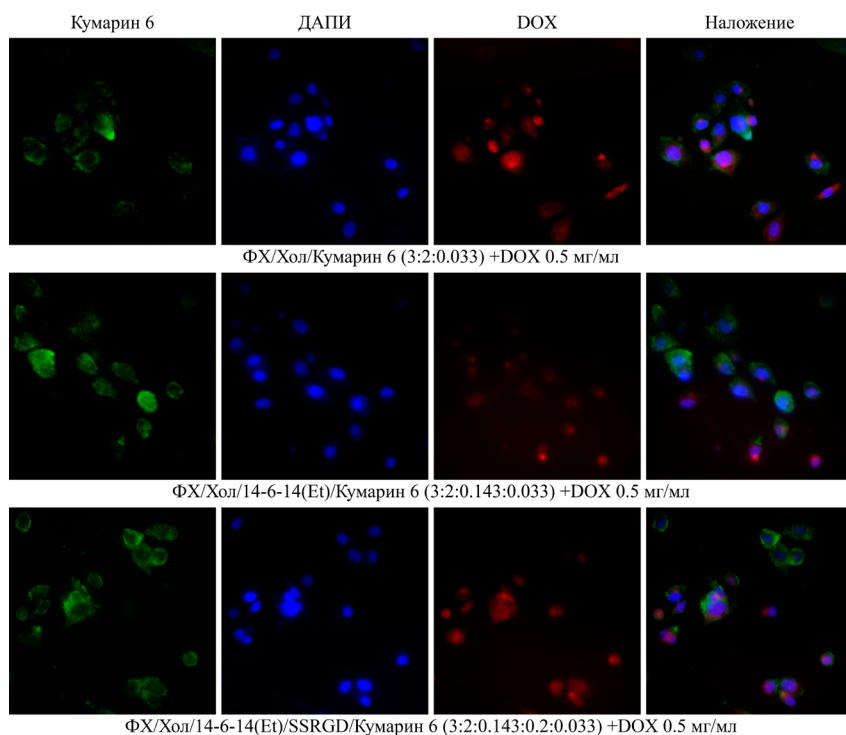


Рисунок 10. Интернализация липосом на основе ФХ/Хол (3:2), содержащих DOX и окрашенных кумарином 6, клетками РС-3, окрашенных ДАПИ, через 24 ч.

ные липосомы из фосфатидилхолина и холестерина, 2) катионные липосомы с ПАВ 14-6-14(Et), 3) катионные липосомы с добавлением ПАВ 14-6-14(Et) и амфифильного пептида SSRGD были загружены противораковым препаратом доксорубицина гидрохлоридом (DOX) и инкубированы с клетками рака простаты РС-3. Данные флуоресцентной микроскопии образцов через 24 ч после инкубации позволяют одновременно отслеживать расположение ядер клеток (ДАПИ, синий), липосом (кумарин 6, зеленый) и DOX (красный) (рисунок 10).

Катионные липосомы, модифицированные гидроксиэтилированными геминальными ПАВ, для доставки 2-ПАМ в мозг

При разработке липосомальной системы доставки в мозг антидота в случае отравлений фосфорорганическими соединениями применение карбаматсодержащих ПАВ неоптимально, поскольку карбаматный фрагмент является фармакофором ингибиторов ацетилхолинэстеразы, а ключевая задача заключается в реактивации этого фермента. Поэтому липосомы на основе ФХ были модифицированы гидроксиэтилированными ПАВ серии 16-s-16(OH), а также загружены модельным гидрофильным красителем родамином Б и лекарственным препаратом пралидоксима хлоридом (2-ПАМ). На примере модельного зонда родамина Б в составе липосомальной формуляции из ФХ, модифицированной ПАВ 16-s-16(OH), варьировали длину спейсерного фрагмента геминальных ПАВ (таблица 7). Наибольшие значения эффективности инкапсуляции (ЕЕ) и загрузки (LC) (49% и 6.5%) получены для липосом, модифицированных ПАВ 16-4-16(OH). Значения эффективности инкапсуляции для липосом, модифицированных ПАВ с длиной спейсерного фрагмента 6 и 10 метиленовых групп, были ниже на 8% (ЕЕ = 41%).

С учетом повышенной эффективности инкапсуляции модельного зонда родамина Б в липосомах ФХ/16-4-16(OH) (35:1) ЕЕ и LC для пралидоксима хлорида оценивали в аналогичной композиции. 2-ПАМ с концентрацией 3.6 мг/мл загружен в немодифицированные липосомы из ФХ с высоким значением эффективности инкапсуляции 81%. Катионная модификация наночастиц понизила значение ЕЕ до 57%, что иллюстрирует влияние заряда липидной мембраны на эффективность инкапсуляции. Растворённая форма 2-ПАМ является катионом, который обладает высоким сродством к мембране из фосфатидилхолина с небольшим отрицательным зарядом. В то же время катион пралидоксима не склонен к взаимодействию с положительно заряженной мембраной липосом, модифицированных катионным ПАВ 16-4-16(OH).

Таблица 7. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ) липосом на основе ФХ, модифицированных гидроксиэтилированными геминальными ПАВ, параметры инкапсуляции гидрофильных субстратов родамина Б и 2-ПАМ после хранения в течение месяца.

Образец	ЕЕ, %	LC, %	1 день			1 месяц		
			D_h , нм	PdI	ζ , мВ	D_h , нм	PdI	ζ , мВ
Родамин Б, 0.5 мг/мл								
ФХ/16-4-16(ОН) (35:1)	49 ± 1	6.5 ± 0.5	109 ± 1	0.070	67 ± 1	119 ± 2	0.447	43 ± 4
ФХ/16-6-16(ОН) (35:1)	41 ± 1	5.4 ± 0.4	114 ± 1	0.059	64 ± 1	122 ± 6	0.322	57 ± 2
ФХ/16-10-16(ОН) (35:1)	41 ± 2	5.5 ± 0.5	112 ± 1	0.060	59 ± 3	106 ± 4	0.092	52 ± 3
2-ПАМ								
ФХ + 3.6 мг/мл 2-ПАМ	81 ± 2	27 ± 1	115 ± 1	0.073	-11 ± 2	Появление осадка		
ФХ/16-4-16(ОН) (35:1) + 3.6 мг/мл 2-ПАМ	57 ± 1	21 ± 0.5	110 ± 1	0.092	58 ± 1	123 ± 1	0.119	38 ± 2
ФХ/16-4-16(ОН) (35:1) + 7 мг/мл 2-ПАМ	71 ± 1	31 ± 2	112 ± 2	0.078	51 ± 2	126 ± 2	0.250	35 ± 2
ФХ/16-4-16(ОН) (35:1) + 10.5 мг/мл 2-ПАМ	72 ± 2	47 ± 1	115 ± 2	0.096	45 ± 2	129 ± 1	0.079	33 ± 1

При загрузке 2-ПАМ липосомы, содержащие дикарбонное ПАВ, после месяца хранения продемонстрировали характеристики, близкие к исходным, в то время как в немодифицированной композиции ФХ появился осадок, и образец более не давал воспроизводимых достоверных результатов при анализе методом ДРС. Структурный анализ липосом с помощью ПЭМ позволил рассмотреть многочисленные агрегаты со средним диаметром 81 нм (рисунок 11). Заметна тенденция везикул приобретать угловатые формы, близкие к прямоугольным.

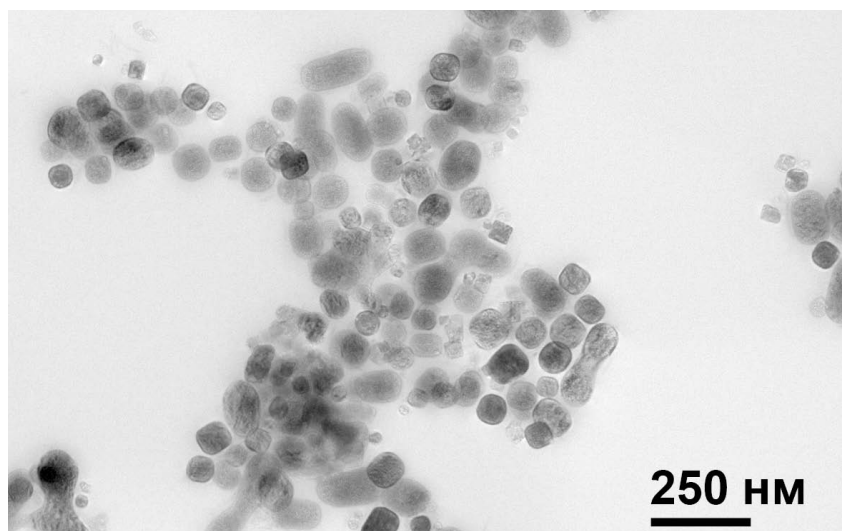


Рисунок 11. Изображения ПЭМ катионных липосом, модифицированных гидроксиэтилированным геминальным ПАВ 16-4-16(ОН).

В литературе подобное явление наблюдается для липосом редко, и, как правило, это объясняют межмолекулярным взаимодействием модифицирующих компонентов липидной мембраны. Не исключено, что геминальное ПАВ 16-4-16(ОН) способствует отклонению форм липосом от сферических именно за счет межмолекулярных взаимодействий гидроксиэтильных фрагментов в составе головной группы.

Фармакокинетические исследования содержания 2-ПАМ в мозге крыс продемонстрировали более чем двухкратное увеличение концентрации оксима в случае липосомальной формы (2240 нг/г) по сравнению со свободной формой (1090 нг/г) (рисунок 12). Это может быть объяснено повышенной способностью катионных липосом проникать в мозг и высвобождать инкапсулированный 2-ПАМ, тогда как в свободной форме кватернизированный оксим не

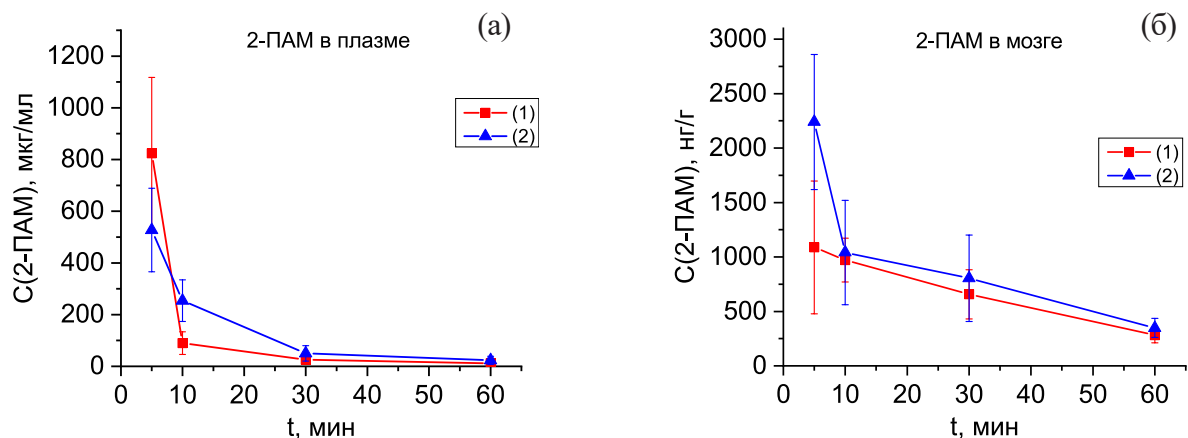


Рисунок 12. Фармакокинетические профили 2-ПАМ: (а) в плазме, (б) в мозге; (1) – незакапсулированный 2-ПАМ, (2) 2-ПАМ в составе липосомальной композиции ФХ/16-4-16(ОН) (35:1).

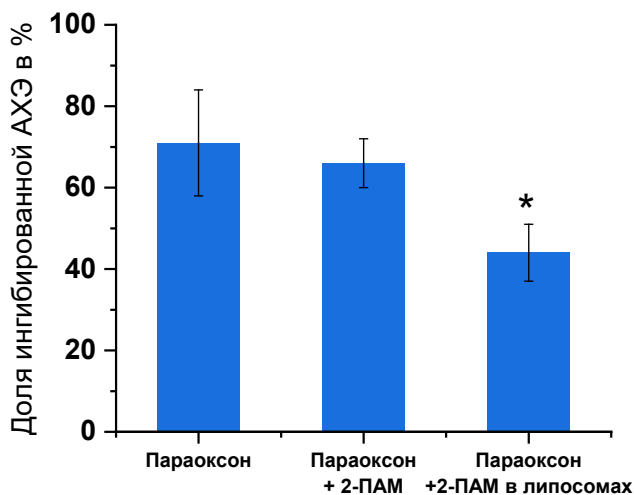


Рисунок 13. Доля ингибированной ацетилхолинэстеразы после отравления параоксоном, после отравления параоксоном и последующей терапии 2-ПАМ, после отравления и терапии липосомальной формой 2-ПАМ.

* $p < 0.05$.

что на момент публикации материала в 2020 году было наивысшим показателем в литературе среди липосомальных форм антидота при внутривенной терапии (рисунок 13).

Разработка порфисом методом нековалентной модификации с использованием очищенных нефтяных порфиринов

При разработке альтернативной формы липосом – порфисом, содержащих порфириновые фотосенсибилизаторы, в состав липосом встраивали ряд демедалированных производных порфирина, включающих гомологи этио- (22.2 мас.%), дезоксофиллоэритроэтио (ДФЭП, 56.5 мас.%), дициклодезоксофиллоэритроэтио (диДФЭП, 11.3 мас.%) и их родо-производных (10.0 мас.%) с максимальным содержанием, приходящимся на C_{32} -ДФЭП-представитель, называемых нефтяными порфиринами (НП).

Путём встраивания НП в состав липосом на основе фосфатидилхолина и холестерина получали порфисомы с содержанием до 2.3 мол.% НП. Наблюдали высокое соответствие спектра 1 мол.% НП в составе липидной мембраны спектру НП в органических растворителях и заметное отличие интенсивности полосы поглощения Сорет при 401 нм от таковой в водном растворе, что говорит о преимущественно мономерном состоянии молекул НП и свидетельствует об успешном встраивании НП в бислои липосом (рисунок 14). Добавление НП в состав липидной мембраны вызывает понижение дзета-потенциала от -11 мВ для липосом с 0.5 мол.% НП до -22.5 мВ в случае 10 мол.% НП. 10 мол.% НП приводит к повышению PdI до значений выше 0.2, что неоптимально для липосомальной системы доставки лекарств. С увеличением загружаемой доли НП эффективность инкапсуляции понижается, и при загрузке более 5 мол.% НП становится неоптимальной (таблица 8). Поэтому для

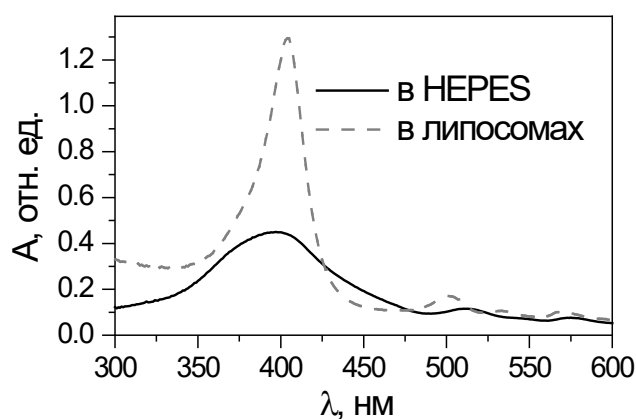


Рисунок 14. Спектры нефтяных порфиринов в буфере HEPES в индивидуальном виде (сплошная линия) и в составе липосом ФХ/Хол (3:2) (пунктир), 1 мол.%. $l = 0.5$ см, 25 °С.

Таблица 8. Гидродинамический диаметр (D_h), индекс полидисперсности (PdI), дзета-потенциал (ζ), эффективность инкапсуляции (ЕЕ) (встраивания, LC) нефтяных порфиринов для порфисом, 25 °С.

НП, мол.%	НП _{загр} , мол.%	ЕЕ(НП), %	D_h , нм	PdI	ζ , мВ
0.5	0.48	95 ± 2	137 ± 1	0.194 ± 0.022	-11 ± 1
1.0	0.84	84 ± 2	119 ± 1	0.083 ± 0.008	-11.8 ± 0.8
2.0	1.45	73 ± 2	129 ± 2	0.117 ± 0.016	-14.5 ± 0.8
5.0	2.10	41 ± 3	114 ± 3	0.104 ± 0.014	-15 ± 1.0
10.0	2.31	23 ± 2	134 ± 2	0.206 ± 0.005	-22.5 ± 0.8

дальнейшей работы в качестве наиболее перспективной формуляции была выбрана система с 1 мол.% НП, реальное содержание НП в которой составляло 0.84 мол.%.

Для оценки возможности применения порфисом на основе НП в качестве системы доставки химиотерапевтических средств, порфисомы с 1 мол.% НП загрузили препаратом DOX в разных концентрациях и проанализировали эффективность инкапсуляции и степень загрузки. В качестве оптимальной была выбрана композиция, содержащая 0.75 мг/мл препарата, которую протестировали на цитотоксичность на клетках опухоли шейки матки М-HeLa и здоровых клетках печени человека Chang Liver. Немодифицированные липосомы с DOX были в 4 раза более токсичны по отношению к клеткам М-HeLa ($IC_{50} = 1.0$ мкг/мл по DOX), чем к здоровым клеткам Chang Liver (4.3 мкг/мл по DOX). Добавление порфирина в состав липосом оказало усиливающий эффект на цитотоксичность по отношению к обеим клеточным линиям: с ростом содержания порфирина наблюдается увеличение токсичности. Формуляция с 1% НП на 14% токсичнее, чем контрольный образец липосом без порфирина, а композиция на основе 2% НП понизила IC_{50} на 29% по отношению к обеим клеточным линиям.

Показано, что облучение лазером с длиной волны 405 нм при мощности излучения 100 мВт/см² вызывает статистически значимое уменьшение рассеянного сигнала, наблюдаемого методом ДРС, в случае порфисом с 2 мол.% и 10 мол.% НП. Это свидетельствует о разрушении некоторой доли порфисом, что может быть востребовано для дистанционного высвобождения содержимого, инкапсулированного в частицы.

Разработка гибридных органо-кремниевых наноконтейнеров для доставки лекарств в клетки глиобластомы T98G

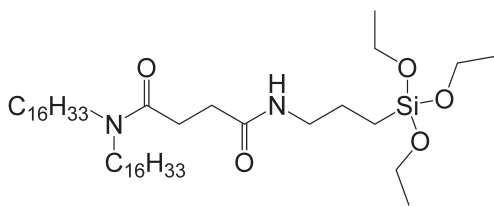


Рисунок 15. Керасомообразующий липид N-[N-(3-триэтоксисил)пропилсукцинаммоил]дигексадециламин (CFL16).

Керасомы являются относительно новым типом везикулярных наночастиц, образованных керасомообразующими синтетическими липидами с триэтоксисилильной группой в составе. Такие частицы в условиях контролируемого кислотного гидролиза способны к самоорганизации в мембраны и к образованию сети ковалентных связей на поверхности, благодаря которой они невосприимчивы к солибилизации ПАВ. Подобные гибридные носители позволяют, сохраняя преимущества традиционных липосом, устранять их ограничения, связанные с низкой стабильностью в физиологической среде и быстрым выведением из организма. Керасомы, образованные из липида N-[N-(3-триэтоксисил)пропилсукцинаммоил]дигексадециламина (CFL16) (рисунок 15), имеют диаметр в пределах 300–400 нм со значениями PdI около 0.3–0.4. Сразу после приготовления дзета-потенциал всех образцов имеет знак «+», что связано с тем, что частицы формируют в слабокислом растворе с pH = 3. Однако при разбавлении образцов буферным раствором с pH = 7.4 дзета-потенциал всех образцов смещается до значений -10 – -20 мВ. В частности, при повышении содержания ФХ в составе наночастиц от 0 до 100% гидродинамический диаметр понижается с 333 нм до 89 нм, а дзета-потенциал возрастает с -20 мВ до -7.0 мВ. Анализ керасом, сформированных методом гидратации тонкой плёнки, с применением ПЭМ показывает образование частиц, обладающих высокой сферичностью, со значениями диаметра 40–400 нм (рисунок 16).

Цитотоксичность не содержащих паклитаксел (РТХ) керасом как анионной, так и катионной (с ПАВ 14-6-14(Et)) природы по отношению к клеткам глиобластомы значительно ниже, чем для содержащих РТХ керасом (таблица 9). Важно отметить, что инкапсуляция РТХ в керасомы резко увеличила цитотоксичность частиц, снижая их значения IC_{50} на два порядка до 2.9–4.6 мкМ, в то время как значения IC_{50} свободного РТХ были зарегистрированы на уровне 8.8 мкМ. Содержание РТХ в керасомах, составляющее 1/25 от общего количества липидов, означает, что IC_{50} этого химиотерапевтического агента находится в диапазоне 115–185 нМ при инкапсуляции в наночастицы. Это примерно в 36 раз меньшая необходимая концентрация для ингибирования 50% клеток, чем в случае свободного РТХ, что демонстрирует преимущество его инкапсуляции в наночастицы. Для клеток линии T98G также выявлена более высокая степень апоптоза при инкубации с керасомами, содержащими РТХ. После инкубации исследуемых объектов в течение 2 ч для систем со свободным РТХ и CFL/ФХ/Твин 80/РТХ/Кумарин 6 (1:1:0.2:0.08:0.013) методом флуоресцентной микроскопии наблюдали эффекты, характерные для ранней стадии апоптоза, в ходе которой клетки уменьшаются в размерах, теряя до 1/3 своего объема. Однако они все еще способны активно делиться. Когда время инкубации увеличили до 6 ч со свободным РТХ и системами CFL/ФХ/Твин 80/РТХ/Кумарин 6 (1:1:0.2:0.08:0.013) и CFL/ФХ/Твин 80/14-6-14(Et)/РТХ/Кума-

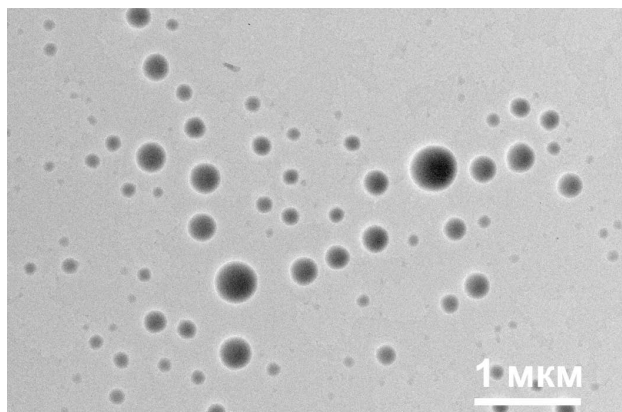


Рисунок 16. Изображение ПЭМ образцов керасом состава CFL16/ФХ (1:1), полученных методом гидратации плёнки.

Таблица 9. Значения IC_{50} керасом состава CFL16/ФХ (1:1), модифицированных ПАВ Твин 80 и 14-6-14(Et), а также керасом, содержащих РТХ, по отношению к клеткам глиобластомы Т98G.

Состав образца	IC_{50} (CFL16), мкМ	IC_{50} (РТХ), мкМ
CFL16/ФХ (1:1)	355 ± 33	-
CFL16/ФХ/Твин 80 (1:1:0.2)	321 ± 29	-
CFL16/ФХ/14-6-14(Et) (1:1:0.057)	341 ± 10	-
РТХ	-	8.8 ± 0.98
CFL16/ФХ/РТХ (1:1:0.04)	2.9 ± 0.07*	0.24 ± 0.10**
CFL16/ФХ/Твин 80/РТХ (1:1:0.2:0.04)	3.3 ± 0.37*	0.26 ± 0.04**
CFL16/ФХ/14-6-14(Et)/РТХ (1:1:0.057:0.04)	4.6 ± 0.20*	0.4 ± 0.04**

* – $p < 0.01$ по сравнению с CFL16/ФХ (1:1); ** – $p < 0.01$ по сравнению с РТХ

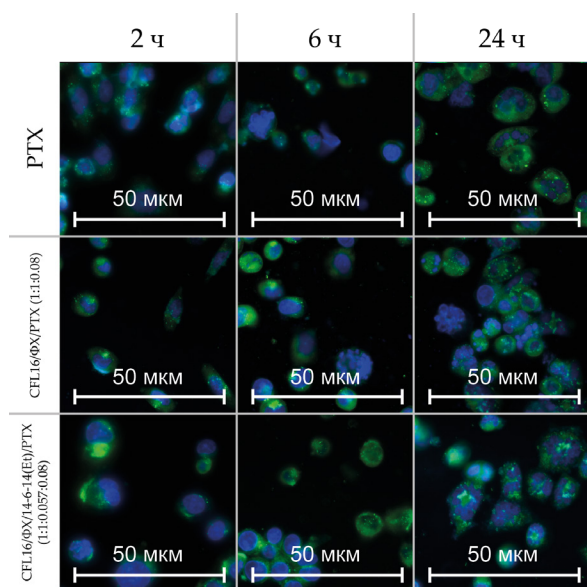


Рисунок 17. Интернализация керасом с добавлением РТХ и индукция апоптоза в клетках Т98G через 2, 6 и 24 ч после инкубации, зарегистрированная методом флуоресцентной микроскопии. Зеленый канал – кумарин 6, синий канал – ДАПИ.

рин 6 (1:1:0.2:0.057/0.08:0.013), апоптотические эффекты возросли, наблюдали фрагментацию ядер и уплотнение цитоплазмы. Через 24 ч инкубации свободного РТХ и систем CFL/ФХ/Твин 80/РТХ/Кумарин 6 (1:1:0.2:0.08:0.013) и CFL/ФХ/Твин 80/14-6-14(Et)/РТХ/Кумарин 6 (1:1:0.2:0.057/0.08:0.013) наблюдали процессы, характерные для позднего апоптоза. В клетках Т98G стала отчетливо видна фрагментация ядер, конденсация цитоплазмы и образование значительного числа апоптотических телец. Подобные процессы наблюдали для всех образцов, содержащих РТХ, после 24 ч инкубации (рисунок 17).

Таким образом, супрамолекулярный подход к модификации и созданию везикулярных наноконтейнеров для доставки лекарств позволяет формировать разнообразные наночастицы, обладающие повышенной способностью преодолевать биологические барьеры (клеточная мембрана, гематоэнцефалический барьер), таргетностью и стимул-отзывчивыми свойствами.

Список использованной литературы

1. Gabdrakhmanov D.R. Soft nanocontainers based on hydroxyethylated geminis: role of spacer in self-assembling, solubilization, and complexation with oligonucleotide / D.R. Gabdrakhmanov, E.A. Vasilieva, M.A. Voronin, D.A. Kuznetsova, F.G. Valeeva, A.B. Mirgorodskaya, S.S. Lukashenko, V.M. Zakharov, A.R. Mukhitov, D.A. Faizullin, V. V. Salnikov, V. V. Syakaev, S.K. Latypov, Y.F. Zuev, L.Y. Zakharova // J. Phys. Chem. C. – 2020. – V. 124. – № 3. – P. 2178-2192.
2. Zakharova L.Ya. Self-assembly strategy for the design of soft nanocontainers with controlled properties / L.Ya. Zakharova, R.R. Kashapov, T.N. Pashirova, A.B. Mirgorodskaya, O.G. Sinyashin // Mendeleev Commun. – 2016. – V. 26. – № 6. – P. 457-468.
3. Tehrani-Bagha A.R. Solubilization of two organic dyes by anionic, cationic and nonionic surfactants / A.R. Tehrani-Bagha, R.G. Singh, K. Holmberg // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. – 2013. – V. 417. – P. 133-139.

4. Pisárčik M. Determination of micelle aggregation numbers of alkyltrimethylammonium bromide and sodium dodecyl sulfate surfactants using time-resolved fluorescence quenching / M. Pisárčik, F. Devínsky, M. Pupák // Open Chem. – 2015. – V. 13. – № 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного диссертационного исследования сформулированы следующие **основные результаты и выводы**:

1. Для новой гомологической серии дикатионных карбаматсодержащих геминальных ПАВ установлены низкие значения порога агрегации в микромолярном диапазоне и высокие значения солюбилизационной емкости по отношению к гидрофобному красителю Оранж ОТ. Рассчитано значение свободной энергии переноса метиленовой группы из водного раствора в неполярное ядро мицелл, равное -3.3 кДж/моль. Показано, что додецильный гомолог в исследованном ряду геминальных ПАВ проявляет сравнимую с ципрофлоксацином антимикробную активность, а по отношению к резистентному штамму *MRSA-1* превосходит антибиотик сравнения на два порядка.

2. Разработан подход по нековалентной модификации липосом катионными амфифильными соединениями: дикатионными карбаматсодержащими геминальными ПАВ и катионным липидом диолеил-3-триметиламмоний пропаном (ДОТАП), придающими электростатическое сродство к отрицательно заряженной клеточной мембране. Установлена зависимость дзета-потенциала липосом от состава и природы катионных модифицирующих компонентов, а также влияние физико-химических параметров липосом (дзета-потенциал, размер и морфология) на их стабильность и функциональные характеристики (цитотоксичность, клеточное поглощение). Показано, что дзета-потенциал модифицированных липосом зависит от логарифма концентрации катионного компонента в составе мембраны. Выявлена линейная корреляция ($r = 0.922$) между эффективностью интернализации частиц и их дзета-потенциалом.

3. Впервые проведена нековалентная модификация катионных липосом амфифильными формами нацеливающих пептидов C_{12} -GGRGD-NH₂, C_{12} -GGGHNK-NH₂ и C_{16} -SSRGD-NH₂, обеспечивающих распознавание и специфическое связывание липосом с клеточными рецепторами. На примере липосомальной формы доксорубина гидрохлорида показано, что комбинированная модификация липосом дикатионным карбаматсодержащим ПАВ и амфифильным пептидом C_{16} -SSRGD-NH₂ улучшает поглощение частиц клетками рака простаты PC-3 и доставку препарата в их ядра.

4. Для создания липосомальных носителей, чувствительных к внешнему импульсу, впервые осуществлена нековалентная модификация липосом порфиринами, выделенными из нефти, способными выступать в качестве фотосенсибилизаторов. Порфисомы, загруженные противораковым препаратом доксорубицином, проявляют селективное цитотоксическое действие по отношению к клеткам карциномы шейки матки M-HeLa. Методом динамического светорассеяния продемонстрирована возможность дистанционной дестабилизации наночастиц под воздействием электромагнитного излучения для инициирования высвобождения лекарств.

5. Впервые осуществлено успешное применение катионных липосом, нековалентно модифицированных гидроксиэтилированными геминальными ПАВ, для реактивации ацетилхолинэстеразы головного мозга после отравления фосфорорганическими соединениями путем внутривенного введения антидота – праалидоксим хлорида. В *in vivo* тестах показано, что разработанная липосомальная форма оксима способна проникать через гематоэнцефалический барьер и позволяет добиться реактивации 27% ацетилхолинэстеразы мозга.

6. Получены стабильные органо-кремниевые наноконтейнеры (керасомы) на осно-

ве керасомообразующего липида и фосфатидилхолина в разных соотношениях для доставки противоракового препарата паклитаксела в клетки глиобластомы T98G. Продемонстрировано 36-кратное усиление цитотоксического действия паклитаксела при инкапсуляции в керасомы по сравнению со свободной формой препарата, а также зарегистрировано проникновение наночастиц – керасом – в мозг крыс *in vivo*.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Выявленные в результате работы закономерности, а именно: зависимости и корреляции между составом липосом и их дзета-потенциалом, между дзета-потенциалом и интенсивностью взаимодействия с клетками, позволяют управлять эффективностью липосомальных композиций в биомедицинских приложениях. С другой стороны, подробная характеристика полученных наночастиц различного состава является фундаментом для формирования более глубокого теоретического представления о влиянии компонентов липидной мембраны на свойства липосом. На основании результатов можно рекомендовать расширение разнообразия амфифильных молекул путем целенаправленного подбора геометрических параметров и заряда головной группы ПАВ для оптимизации физико-химических параметров липосомальных наноконтейнеров.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. **Pavlov, R.** Biomedical potentialities of cationic geminis as modulating agents of liposome in drug delivery across biological barriers and cellular uptake / R.V. Pavlov, G.A. Gaynanova, D.A. Kuznetsova, L.A. Vasileva, I.V. Zueva, A.S. Sapunova, D.N. Buzyurova, V.M. Babaev, A.D. Voloshina, S.S. Lukashenko, I.Kh. Rizvanov, K.A. Petrov, L.Ya. Zakharova, O.G. Sinyashin // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 587. – P. 119640.

2. Kashapov, R. Self-assembly of amphiphilic compounds as a versatile tool for construction of nanoscale drug carriers / R. Kashapov, G. Gaynanova, D. Gabdrakhmanov, D. Kuznetsov, **R. Pavlov**, K. Petrov, L. Zakharova, O. Sinyashin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 18. – P. 6961.

3. Kashapov, R. Nanocarriers for biomedicine: from lipid formulations to inorganic and hybrid nanoparticles / R. Kashapov, A. Ibragimova, **R. Pavlov**, D. Gabdrakhmanov, N. Kashapova, E. Burilova, L. Zakharova, O. Sinyashin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 13. – P. 7055.

4. Zoughaib, M. Amphiphilic RGD and GHK peptides synergistically enhance liposomal delivery into cancer and endothelial cells / M. Zoughaib, **R.V. Pavlov**, G.A. Gaynanova, R. Garifullin, V.G. Evtugyn, T.I. Abdullin // *Materials Advances*. – 2021. – Vol. 2. – № 23. – P. 7715-7730.

5. Valeeva, F.G. Introduction of isothiuronium surfactant series: Synthesis, structure-dependent aggregation overview and biological activity / F.G. Valeeva, T.R. Karimova, **R.V. Pavlov**, D.I. Bakhtiyarov, A.S. Sapunova, K.A. Ivshin, O.N. Kataeva, G.A. Gaynanova, V.V. Syakaev, A.D. Voloshina, Sh.K. Latypov, L.Ya. Zakharova // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Vol. 324. – P. 114721.

6. **Pavlov, R.V.** Preparation and cytotoxic properties of porphysomes based on petroleum porphyrins / R.V. Pavlov, N.A. Mironov, G.A. Gaynanova, A.P. Lyubina, A.D. Voloshina, M.R. Yakubov, L.Ya. Zakharova // *Russian Chemical Bulletin*. – 2022. – Vol. 71. – № 9. – P. 1992-1997.

7. **Pavlov, R.V.** A study involving PC-3 cancer cells and novel carbamate gemini surfactants: Is zeta potential the key to control adhesion to cells? / R.V. Pavlov, G.A. Gaynanova, D.A. Kuznetsov, Ya.A. Ivanov, S.K. Amerkhanova, A.P. Lyubina, A.D. Voloshina, L.Ya. Zakharova // *Smart Materials in Medicine*. – 2023. – Vol. 4. – P. 123-133.

8. **Pavlov, R.** The formation of morphologically stable lipid nanocarriers for glioma therapy / R. Pavlov, E. Romanova, D. Kuznetsov, A. Lyubina, S. Amerhanova, A. Voloshina, D. Buzyurova, V.

Babaev, I. Zueva, K. Petrov, S. Lukashenko, G. Gaynanova, L. Zakharova // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 4. – P. 3632.

9. **Pavlov R.V.** Mixed liposomes based on phosphatidylcholine and cationic geminis / Pavlov R.V., Gaynanova G.A., Vasileva L.A., Kuznetsova D.A., Zueva I.V., Sapunova A.S., Voloshina A.D., Lukashenko S.S., Petrov K.A., Zakharova L.Ya. // Book of Abstracts. Supramolecular Strategies in Chemistry, Biology and Medicine: Fundamentals and perspectives. – 2019. – P. 25. (устный доклад)

10. Mirgorodskaya A. The lipid nanocontainers modified with cationic geminis / Mirgorodskaya A., Gaynanova G., Kuznetsova D., Vasileva L., **Pavlov R.**, Zueva I., Sapunova A., Voloshina A., Lukashenko S., Petrov K., Zakharova L. // Book of abstracts. 33rd Conference of The European Colloid and Interface Society. – 2019. – P. 184.

11. **Pavlov R.V.** Cationic geminis as modulating agents of liposome in drug delivery across biological barriers / Pavlov R.V., Kuznetsova D.A., Vasileva L.A., Zueva I.V., Sapunova A.S., Buzyurova D.N., Babaev V.M., Gaynanova G.A., Voloshina A.D., Petrov K.A., Zakharova L.Ya. // Book of Abstracts. Supramolecular Strategies in Chemistry, Biology and Medicine: Fundamentals and perspectives. – 2020. – P. 57.

12. **Павлов Р.В.** Синтез керасомообразующих липидов с углеводородными заместителями разной длины: влияние на способность к формированию керасом / Павлов Р.В., Гайнанова Г.А., Лукашенко С.С., Захарова Л.Я. // Сборник тезисов. II Научная конференция «Динамические процессы в химии элементоорганических соединений». – 2020. – С. 149.

13. **Pavlov R.V.** Hydroxyethylated and carbamate-bearing gemini surfactants: an insight into aggregation for the development of biomedical nanocontainers / Pavlov R.V., Gaynanova G.A., Kuznetsov D.M., Vasilieva E.A., Gabdrakhmanov D.R., Kuznetsova D.A., Vasileva L.A., Petrov K.A., Zakharova L.Ya., Sinyashin O.G. // Book of Abstracts. 35th Conference of the European Colloid & Interface Society (ECIS). – 2021. – P. 195.

14. **Pavlov R.V.** Cationic liposomes decorated with oligopeptides for enhanced tumor targeting / Pavlov R.V., Zoughaib M., Gaynanova G.A., Abdullin T.I., Evtugyn V.E., Garifullin R., Zakharova L.Ya. // Book of Abstracts. Lipids 2021. – 2021. – P. 135. (устный доклад)

15. Иванов Я.А. Геминальные ПАВ с биоразлагаемыми фрагментами как мицеллярные наноконтейнеры и модификаторы поверхности липосом / Иванов Я.А., Валеева Ф.Г., **Павлов Р.В.**, Кузнецов Д.М., Гайнанова Г.А., Амерханова С.К., Волошина А.Д., Захарова Л.Я. // Сборник тезисов. III Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием). – 2021. – С. 70.

16. **Pavlov R.V.** Aggregation of carbamate gemini surfactants and their potential as liposome modifiers / Pavlov R.V., Gaynanova G.A., Kuznetsov D.M., Ivanov Ya.A., Zakharova L.Ya. // Book of Abstracts. XXIII International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia. – 2022. – P. 113. (устный доклад)

17. **Павлов Р.В.** Геминальные катионные ПАВ в главной роли в липосомальных системах доставки лекарств: *in vitro* и *in vivo* доказательства эффективности / Павлов Р.В., Гайнанова Г.А., Волошина А.Д., Петров К.А., Захарова Л.Я. // Сборник тезисов. III Научная конференция «Динамические процессы в химии элементоорганических соединений». – 2022. – С. 59. (устный доклад)

18. **Pavlov R.V.** Petroleum porphyrins for production of porphosomes for photodynamic anticancer therapy: a proof of concept / Pavlov R.V., Mironov N.A., Gaynanova G.A., Lyubina A.P., Voloshina A.D., Yakubov M.R., Zakharova L.Ya. // Book of Abstracts. Supramolecular Strategies in Chemistry, Biology and Medicine: Fundamentals and perspectives. – 2022. – P. 52.

